# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN



(11)Publication number:

2000-279179

(43)Date of publication of application: 10.10.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A61K 39/02
A61K 39/395
C07K 14/195
C07K 16/12
C12P 21/02
C12P 21/08
G01N 33/569
G01N 33/577
//(C12N 15/09
C12R 1 01 )
(C12P 21/02
C12R 1:08 )

(21)Application number: 11-094004

(71)Applicant: NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL HEALTH

HIGETA SHOYU CO LTD

**FUJITA GAKUEN** 

(22)Date of filing:

31.03.1999

(72)Inventor: TAKAGI HIROAKI

TAKAGI HIROAKI EBISU SHOGO

WATANABE FUMIKO MURAHASHI YASUAKI YOKOMIZO YUICHI IMADA YUMIKO

TSUJI TAKAO

# (54) RECOMBINANT SUBUNIT VACCINE AGAINST ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE (57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new polypeptide which has a specific amino acid sequence, has an activity of inducing defense and immunization against infection and pathogenesis by Erysipelothrix rhusiopathiae, and is useful as a vaccine effective for treating and preventing the infection of E.rhusiopathiae and so on. SOLUTION: This is a new recombinant polypeptide which has the amino acid sequence shown by the formula or an amino acid sequence obtained by deleting, substituting, adding, or inserting one or more amino acid(s) from, in, to, or into the amino acid sequence, has an activity of inducing defense and immunization against infection and pathogenesis by Erysipelothrix rhusiopathiae, and is useful as a vaccine effective for treating and preventing the infection of E.rhusiopathiae and so on. This polypeptide is obtained by preparing a genomic library from chromosomal DNA of strain Fujisawa which is a typical strong pathogen of E.rhusiopathiae, screening the obtained library with a probe having its partial sequence, incorporating the obtained gene into a vector, transforming a host cell such as Bacillus brevis, followed by culturing the obtained transformant.

Aug. San. Line Asp. in dar part the Proteen Tie Giv Giv Giv Bul Giv.

15.

Let Leu Zio Val Leu Jao Giv Tax Siy Yal Ilis Alia Cia Ciu Tyo Asp.
20.

Lys Met The Asp. alia Lyr. Lin. Giv Law Val. San. Leu Liu Asp. Lin.

Set Leu bul Lys. Ser The Clin Ann Clai Clin Ser Ann Ser 192, Val Clin 370 - 265 - 380 Proc Clin Ser Pro and Lys (bal Clin Lys. em.) 385 - 400 Lys. Ass

# LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

31.03.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection] [Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application

converted registration] [Date of final disposal for application] [Patent number] 3072345 02.06.2000 [Date of registration] [Number of appeal against examiner's decision of

rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

# (12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号 特開2000-279179 (P2000-279179A)

(43)公開日 平成12年10月10日(2000.10.10)

(51) Int.Cl.7		識別記号		FΙ			. Ť	-7J-ド( <del>参考</del> )
C12N	15/09	ZNA		C 1 2 N	15/00		ZNAA	4B024
A 6 1 K	39/02			A 6 1 K	39/02			4B064
	39/395				39/395		D	4 C 0 8 5
	•						R	4H045
C07K	14/195			C07K	14/195			
			審査請求	有 請求	<b>R項の数16</b>	OL	(全 23 頁)	最終頁に続く

(21)出願番号

特願平11-94004

(22)出願日

平成11年3月31日(1999.3.31)

(71)出願人 591111248

農林水産省家**畜衛生試験場長** 茨城県つくば市観音台3-1-1

(71)出願人 000112060

ヒゲタ醤油株式会社

東京都中央区日本橋小網町2番3号

(71)出顧人 000125381

学校法人藤田学園

愛知県豊明市栄町南舘12番地の1

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

# (54) 【発明の名称】 豚丹毒菌の組換えサブユニットワクチン

# (57)【要約】

(修正有)

【課題】 豚丹毒菌感染を治療または予防するためのワクチンの提供。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列を有するポリペプチド、または、上記アミノ酸配列において1個または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚丹毒菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を有するポリペプチド、このポリペプチドをコードするDNA、このDNAを利用する組換えDNA技術によるポリペプチドの製造方法、このポリペプチドを含む豚丹毒菌感染を治療または予防するためのワクチン、あるいは、そのための方法。

30

### 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)に示すポリペプチ ۲.

- (a) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポ リペプチド
- (b) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において1 個または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加され たアミノ酸配列を有し、かつ豚丹毒菌に対する感染、発 病防御免疫誘導活性を有するポリペプチド

【請求項2】 請求項1に記載のポリペプチドをコード 10 するDNA。

【請求項3】 配列表の配列番号2に示すヌクレオチド 配列を有する、請求項2に記載のDNA。

【請求項4】 請求項1に記載のポリペプチドの製造方 法であって、請求項2または3に記載のDNAを含む発 現べクターを作製し、該ベクターで宿主細胞を形質転換 し、該形質転換された宿主細胞を培地に培養し、生成し た該ポリペプチドを回収することを含む方法。

【請求項5】 前記宿主細胞がパチルス・ブレビスであ る、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 前記DNAがその5'末端にバチルス・ ブレビス由来のシグナルペプチドをコードするDNA配 列を含み、バチルス・ブレビス由来のプロモーターに作 動可能に結合されている、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 請求項4~6のいずれかに記載の方法に よって製造されたポリペプチド。

【請求項8】 請求項1または7に記載のポリペプチド を含む豚丹毒菌感染の治療または予防用のワクチン。

【請求項9】 アジュバントを含む、請求項8に記載の ワクチン。

【請求項10】 前記アジュバントが大腸菌の変異無毒 組換え易熱性腸管毒素 (rmLT) である、請求項9に記載 のワクチン。

【請求項11】 請求項1または7に記載のポリペプチ ドに対する抗体。

【請求項12】 ポリクローナルまたはモノクローナル 抗体である、請求項11に記載の抗体。

【請求項13】 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する 可能性のある動物(ヒトを除く)に請求項8~10のい ずれかに記載のワクチンまたは請求項11もしくは12 40 に記載の抗体を投与することを含む、豚丹毒菌感染を治 療または予防する方法。

【請求項14】 前記投与が鼻腔内投与等の経粘膜投与 によって行われる、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する 可能性のある動物 (ヒトを除く) に、請求項1または7 に記載のポリペプチドとrmLTアジュバントとの混合物 を、場合によりさらに担体を加えて、鼻腔内投与等の経 粘膜投与することを含む、豚丹毒菌攻撃に対する感染、 発病防御免疫誘導する方法。

【請求項16】 請求項1もしくは7に記載のポリペプ チドまたは請求項11もしくは12に記載の抗体の、ワ クチン接種動物または移行抗体を保有する幼若動物の豚 丹毒菌感染防御免疫レベルの評価、あるいは動物の豚丹 毒菌感染の検出への使用。

#### 【発明の詳細な説明】

[0001]

【発明の属する技術分野】本発明は豚丹毒菌の組換え防 御ポリペプチド抗原 (recombinant protective polypept ide antigen: rPPA)、その製法、該ポリペプチドをコー ドするDNA、該ポリペプチドに対する抗体、サブユニ ットワクチンとしての該ポリペプチドの使用に関する。 [0002]

【従来の技術】豚丹毒菌 (Erysipelothrix rhusiopathi ae) は豚、イノシシ、鯨類、鶏、七面鳥などの食用動物 に病原性をもち、畜産の生産性に大きな被害を与えてき た。家畜伝性病予防法において豚丹毒は監視伝性病の一 つに指定され豚において年間3,000頭前後の発生報 告がある。また本菌は人にも病原性をもつこと、食肉処 理場での多数の豚丹毒症例が摘発されることから、豚肉 や内臓から生産される食品の安全性にも脅威となってい る。

【0003】わが国では、強毒株をアクリフラビン添加 培地で長期継代して作製された豚丹毒菌弱毒株Koganei 株から製造された凍結乾燥生ワクチンがひろく豚丹毒菌 感染の防御のために使用されてきたが、問題点として、 マウスに関節炎発症の病原性をもつこと、抗体の低い豚 やSPF豚において重篤な副作用を示すこと、また慢性 豚丹毒症例豚の病変からワクチン株が分離されることが 指摘されている。

【〇〇〇4】一方、不活化ワクチンとしては、豚丹毒菌 強毒株の培養菌液をホルマリンで殺菌処理し、その全菌 体及び菌体外生産物を水酸化アミニウムゲルに吸着させ て製造したパクテリンワクチン及び全菌体からアルカリ 水溶液で抽出した菌体表層非精製蛋白質画分から成る成 分ワクチンが豚丹毒の予防用ワクチンとして用いられて いる。アルカリ抽出蛋白質画分中の有効成分としては、 64~66kDaの蛋白質抗原がマウスで感染防御活性 を示すとされる (Epidemio. Infect., 107:637-649, 199 1)。

【0005】他方、本菌の防御抗原の遺伝子組換え体と しては、Galan と Timonyが豚丹毒菌の 5. 4 k b の遺 伝子断片で組換えたファージを感染させた宿主大腸菌の 溶解物上清で免疫したマウス群では14~17%が感染 死に対する防御活性を示すこと、また、同溶解物上清に 対する免疫血清は66、54、43kDaの蛋白質と反応 することを示した (Infect. Immun., 58: 3116-3121, 199

【0006】最近、豚丹毒菌に対して感染防御活性を有 50 するモノクローナル抗体が、血清型2型豚丹毒菌Tama96

株の64kDaの表面蛋白質を認識すること、またその表面蛋白質の遺伝子がクローニングされ、塩基配列と606アミノ酸の配列が決定され、C末に8個の相似な繰り返し配列(19個のアミノ酸からなる8番目の配列以外は20個のアミノ酸からなる。)をもつことが報告された(Microbial Pathogenesis, 25:101-109, 1998)。この64kDa蛋白質はSPAと命名されている。

【0007】SPAをコードする遺伝子で組換えた大腸菌の生菌を接種したマウスは、豚丹毒菌の攻撃に対し防御が成立する。またSPAのうち、菌細胞膜に固着する 10側のC末繰り返し配列部分が防御活性に必須であることが報告された(Microbial Pathogenesis, 25:101-109,1998)

【0008】さらに、血清型1型のFujisawa株の感染防 御抗原の遺伝子も同様の配列をとるが、C末の繰り返し 配列が1個多く、626個のアミノ酸からなり、C末に は9個の相似な繰り返し配列(19個のアミノ酸からな る9番目の配列以外は20個のアミノ酸からなる。)を もつこと、その遺伝子がコードする蛋白質は69kDa の蛋白質であることが示された(今田由美子、Proc Jpn 20 Pig Vet Soc No. 34, pp. 12-15, 1999) 。ここで得られ た遺伝子全長または遺伝子全長からC末の繰り返し塩基 配列を除いた遺伝子または全長のN末側の一部とC末の 繰り返し塩基配列を除いた1029bpの塩基配列で組 換えた大陽菌からヒスチジンヘキサマ一融合蛋白質とし て得られた組換え蛋白質は、フロイントコンプリートア ジュバント(実用ワクチン用には使用不可)の存在下で 感染防御効果を示したと報告されている(今田、上 記)。

【0009】しかし、今まで報告された豚丹毒菌の感染 30 防御抗原の組換え体は、ヒスチジンへキサマーなどとの 融合ポリペプチドとして、しかも大腸菌体内に生産させ たものであり、プラスミド宿主菌体外の外分泌系として 生産する方法はこれまで知られていない。また豚丹毒菌 の感染防御抗原の組換え体を、防御免疫誘導のための実 用ワクチンとして利用する免疫方法もない。さらに、粘 膜経路(経鼻、経口、経直腸)でのワクチン投与法の開 発が、動物へのストレス軽減、省力化、粘膜局所での免 疫誘導を目的として要望されているが、豚用の組換え抗 原に対する経粘膜免疫方法による防御免疫付与方法は知 40 られていない。さらにまた、マウスでは大腸菌変異易熱 性腸管毒素(mLT)が粘膜アジュバントとして、粘膜投 与蛋白質抗原の免疫原性を増強するが(Immunology, 9 0:176-182,1997)、豚などの家畜ではmLTの粘膜アジュ バント活性は知られていない。

#### [0010]

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、安全性と有効性に優れた高純度の豚丹毒菌の防御抗原活性のあるポリペプチド、ならびにその製造方法を提供することである。本発明の別の目的は、上記ポリペプチドを組 50

4

換えサブユニットワクチンとして使用すること、ならび に動物に対しこのワクチンを投与して豚丹毒菌感染を治 療または予防するための方法を提供することである。

【0011】このために、本発明者らは、(a) 防御抗原遺伝子の一部ポリヌクレオチドを非融合状態で効率よく外分泌発現させるためのベクター・宿主系を確立すること、(b) その培養液から防御活性の高い組換えポリペプチド抗原を単純工程で精製する実用技術を確立すること、(c) 最も発現量が高く収量の優れるポリヌクレトチド断片を特定すること、(d) 動物に感染・発病防御免疫を誘導する組換えポリペプチド抗原を選択すること、ならびに、(d) 得られた抗原を筋肉、皮下、皮内注射または経粘膜投与により動物に強力な感染・発病防御免疫を誘導するための技術を確立することを目的として鋭意研究を行ってきた。

#### [0012]

【課題を解決するための手段】その結果、本発明者ら は、豚丹毒菌(後述の実施例ではIa型菌Fujisawa株を 使用した。)の感染防御抗原遺伝子のうち、従来必要と されていたC末の繰り返し配列からなる断片をコードす るDNA配列とN末の分泌シグナルをコードするDNA 配列を削除したポリヌクレオチドで組換えたバチルス・ ブレビスの大量培養液の除菌液から夾雑物を効率的に除 去し、防御免疫誘導活性をもつ高純度の46.5kDaのrPPA (46.5kPPAと略す)を製造できる方法を今回見出した。 すなわち、46.5kPPAの効率的な分泌生産系を設計し、宿 主細菌の培養上清から容易に目的組換えポリペプチドを 精製する技術を確立した。また、46.5kPPAを家畜用アジ ュパントの併用をもって注射することにより、あるいは マウスで粘膜アジュバント活性が知られる大腸菌の変異 無毒組換え易熱性陽管毒素(mLT)とともに経鼻免疫す ることにより、豚丹毒菌に対する感染・発病防御免疫能 を誘導する技術を確立した。以上の知見から、46.5kPPA は動物の豚丹毒菌感染予防用のサブユニットワクチンと しての利用価値を有することが判明した。また、バチル ス・ブレビスで発現して得られた46.5kPPAは豚丹毒菌の 副作用に関係する菌体成分を全く含まないため、ワクチ ンの安全性の改善に貢献する。このような優れた性能を もつ新しいワクチンは動物のみならず人にも応用可能で あると考えられる。

【 O O 1 3 】従って、本発明は以下のように要約される。

- (1)以下の(a)又は(b)に示すポリペプチド。
- (a) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチド
- (b) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において1個または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚丹毒菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を有するポリペプチド
- (2) 上記(1) に記載のポリペプチドをコードするD

NA.

(3) 配列表の配列番号2に示すヌクレオチド配列を有する、上記(2)に記載のDNA。

【 O O 1 4 】 (4) 上記(1)に記載のポリペプチドの製造方法であって、上記(2)または(3)に記載の D N A を含む発現ベクターを作製し、該ベクターで宿主 細胞を形質転換し、該形質転換された宿主細胞を培地に 培養し、生成した該ポリペプチドを回収することを含む 方法。

- (5) 前記宿主細胞がパチルス・ブレビスである、上 10 記(4) に記載の方法。
- (6) 前記DNAがその5'末端にバチルス・ブレビス由来のシグナルペプチドをコードするDNA配列を含み、バチルス・ブレビス由来のプロモーターに作動可能に結合されている、上記(5)に記載の方法。

【0015】(7) 上記(4)から(6)のいずれかに記載の方法によって製造されたポリペプチド。

- (8) 上記(1)または(7)に記載のポリペプチドを含む豚丹毒菌感染の治療または予防用のワクチン。
- (9) アジュバントを含む、上記(8)に記載のワク 20チン。
- (10) 前記アジュバントが大腸菌の変異無毒組換え 易熱性腸管毒素 (rmLT) である、上記 (9) に記載のワ クチン。
- (11) 上記(1)または(7)に記載のポリペプチドに対する抗体。

【0016】(12) ポリクローナルまたはモノクロ 一ナル抗体である、上記(11)に記載の抗体。

(13) 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性 のある動物 (ヒトを除く) に上記 (8) ~ (10) のい 30 ずれかに記載のワクチンまたは上記 (11) もしくは

(12) に記載の抗体を投与することを含む、豚丹毒菌 感染を治療または予防する方法。

(14) 前記投与が鼻腔内投与等の経粘膜投与によって行われる、上記(13)に記載の方法。

【0017】(15) 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性のある動物(ヒトを除く)に、上記(1)または(7)に記載のポリペプチドとrmLTアジュバントとの混合物を、場合によりさらに担体を加えて、鼻腔内投与等の経粘膜投与することを含む、豚丹毒菌攻撃に対 40する感染、発病防御免疫誘導する方法。

(16) 上記(1)もしくは(7)に記載のポリペプ チドまたは上記(11)もしくは(12)に記載の抗体 の、ワクチン接種動物または移行抗体を保有する幼若動 物の豚丹毒菌感染防御免疫レベルの評価、あるいは動物 の豚丹毒菌感染の検出への使用。

【 0 0 1 8 】本明細書中で使用する「感染、発病防御免疫誘導」、「感染、発病防御免疫誘導活性」、「感染、発病防御免疫誘導能」とは、豚丹毒菌による感染または発病から動物を免疫学的に防御するための抗体産生を生 50

6

体内で誘導すること、あるいはそのような誘導活性または誘導能力を意味する。また、本明細書中で使用する「作動可能に」とは、DNAのmRNAへの転写が可能であることを意味する。

[0019]

【発明の実施の形態】本発明は、第1の態様において、
豚丹毒菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を有する
上記(a)または(b)に規定する配列番号1に示される
アミノ酸配列を有するポリペプチド、およびその変異体
を提供する。配列番号1に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドは、豚丹毒菌の代表的強毒株であるFujisawa
株の感染防御抗原遺伝子クローニング、オープンリーディングフレームの解読、防御抗原遺伝子の特定の塩基配
列断片のサブクローニング、発現プラスミドの構築、形質転換宿主細胞での分泌生産、豚丹毒菌に対する防御免疫誘導能の確認によって得ることができる。

【0020】本発明のポリペプチドは、感染防御抗原として必須の領域の探索に基づいて見出されたが、これは今田(上記)によって報告された69kDa感染防御抗原

(597アミノ酸)のうち30番目~431番目からな る402アミノ酸(46.5kDaという;図4)で構成されてい る。従って、本発明のポリペプチドは、69kDa抗原の うちN末の29アミノ酸からなる分泌シグナル配列、C 末のグリシン、トリプトファンではじまる各20アミノ 酸からなる配列の8回の繰り返し配列とその前後の35 アミノ酸が取り除かれた配列を有している。C末の繰り 返し配列は、該病原菌の膜に固定するためのアンカーの 役割を果たしていると推定され、感染防御免疫誘導能を もたないこと、および感染防御抗原を細菌発現させよう とするときに、おそらくそのアンカー機能のために、抗 原の回収率を著しく悪くさせる原因となることが判明し た。さらに、配列番号1に示されるアミノ酸配列のうち N末の60アミノ酸を欠損させた342アミノ酸からな る4 OkDaポリペプチド抗原を作製し、それのマウスに おける感染致死防御免疫誘導能を測定した結果、同一用 量での比較において本発明の46.5kDaポリペプチド抗原 より防御免疫誘導能が著しく劣ることが判明した(表2 参照)。この結果は、該60アミノ酸が感染防御に極め て重要であることを示唆している。40kDaポリペプチ ドはまた、組換えDNA技術を用いたパチルス・ブレビ スによる発現の際に本発明の46.5kDaポリペプチドの約2 50分の1の分泌生産量であり(実施例3参照)、該60ア ミノ酸がポリペプチド抗原の発現分泌にとって必須の領 域であることが示唆される。

【0021】このように、本発明のポリペプチドは、免疫学的防御能においても、また発現分泌生産にとっても、豚丹毒菌感染の治療および予防において高い実用性を有している。本発明にはまた、配列番号1に示すアミノ酸配列において1個または数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有し、かつ豚丹毒

菌に対する感染、発病防御免疫誘導活性を有するポリペ プチドも含まれる。

【〇〇22】このような変異の仕方には制限はないが、 例えば配列番号 1 に示すポリペプチドをコードするDN A配列を基にオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異法 やカセット変異法などの部位特異的突然変異技術(例え ftShort Protocols In Molecular Biology, Third Edit ion, A Compendium of Methods from Current Protocol s in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. 参 照)、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)などの技術を用 10 いて変異DNAを得て、これを適当な宿主細胞で発現さ せて製造することができる。アミノ酸間の置換では、酸 性アミノ酸同士、塩基性アミノ酸同士、疎水性アミノ酸 同士で構造的に類似するアミノ酸間の置換があり、この ような置換は天然においても認められる。例えばバリン とイソロイシン、グルタミン酸とアスパラギン酸、アル ギニンとリシンが置換例としてあげられる。欠失につい ては、配列番号1に示すアミノ酸配列のN末の60アミ ノ酸以外の(単数または複数の)アミノ酸の部分的欠失が 考えられるが、あくまでも豚丹毒菌に対する感染、発病 20 防御免疫誘導活性を損なわない範囲で欠失を行う必要が ある。付加の場合にも防御免疫誘導活性を損なわない範 囲の変異でなければならないが、例えばN末またはC末 への(単数または複数の)アミノ酸の付加が可能であろ う。この場合、豚丹毒菌 6 9 kDa感染防御抗原(今田、上 記)に認められるN末の29アミノ酸からなる分泌シグ ナル配列と、C末の繰り返し配列を含む179アミノ酸か らなる配列は含むべきではない。配列番号1に示すアミ ノ酸配列との相同性で言えば、上記変異体は70%以 上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以 上、特に95%以上の相同性を有しているべきである。 この点では、豚丹毒菌のFujisawa株、その変異体だけで なく、その他の株(例えば豚丹毒菌1b型、2a型、2b型な ど)およびその変異体に由来する同様の抗原断片のすべ てが本発明の範囲内である。

【0023】本発明は、第2の態様において、上記(a)、(b)に規定したポリペプチドをコードするDNAを提供する. 好適実施態様により、該DNAは配列番号2に示すヌクレオチド配列を有するDNAである。本発明のDNAは、豚丹毒菌の染色体DNAをはRNAからゲノ 40ムクローニングまたはcDNAクローニング法(J. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)をもちいて得ることができる。例えば、該細菌の染色体DNAまたはRNAからゲノムライブラリーまたはcDNAライブラリーを作製し、適当なプローブを用いて目的のDNAを含むクローンをコロニーハイブリダイゼーションまたはプラークハイブリダイゼーションを利用してスクリーニングするか、あるいは、適当なプライマーを用いてPCR増幅することによって目的50

8

のDNAを得ることができる。必要に応じて、種々の制限酵素によりDNAの制限酵素地図を作成し、これに基づき目的DNAを切り出すことができる。また、得られたDNAをジデオキシ法等の慣用の塩基配列決定法により配列決定し、目的のDNAであることを確認することができる。このようにして配列が判明した場合には、DNA合成機にて目的のDNAを化学的に合成することも可能である。

【0024】上記で使用されるプローブまたはプライマ 一は、配列番号1に示されるアミノ酸配列または配列番 号2に示されるヌクレオチド配列、その相補的配列に基 づいて作製することができ、5塩基以上、通常5~60 塩基、好ましくは15~30塩基である。それらは特に 株間で比較的保存された領域から選択されるのがよい。 ハイブリダイゼーション条件は、融解温度(Tm)、イオ ン強度などを適宜考慮して決定でき、ストリンジェント な条件でのハイブリダイゼーションとその後のストリン ジェントな条件での洗浄が望ましい。PCR条件として は、二本鎖DNAを変性させる変性段階(例えば94 ℃、15~30秒)、一本鎖鋳型DNAとプライマーを アニーリングさせるアニーリング段階(例えば54℃、 3 O秒から1分)、DNAポリメラーゼと4種類の基質 (dNTP) の共存下でのプライマーの伸長段階(例えば7 0℃、30秒~1分)を1サイクルとして20サイクル以 上操作を繰り返すことができる。但しPCR条件は鋳型 DNAの濃度、増幅断片のサイズ等に応じて変更され得 る。PCR法については例えば、蛋白質核酸酵素41巻5 号「PCR法最前線」(1996年4月号増刊)を参照するこ とができる。

【0025】本発明は、第3の態様において、上記に規定したDNAを含む発現ベクターを作製し、該ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換された宿主細胞を培地に培養し、生成した該ポリペプチドを回収することを含む、上記に規定したポリペプチドの製造方法を提供する。本発明のポリペプチドは、分泌形態または非分泌形態のいずれで生産されてもよいが、分離精製の容易さから分泌形態が好ましい。分泌形態の場合、該ポリペプチドをコードするDNAの上流に任意のシグナルペプチドをコードするDNA配列を連結させる。

【0026】発現ベクターとしては、原核または真核生物宿主細胞において自律複製可能または染色体中への組込み可能であって、目的DNAの転写が可能な位置にプロモーターを含有しているものを選択できる。ベクターはプラスミド、ファージを含むウイルス、コスミドなどである。ベクターにはさらに、選択マーカー、リボソーム結合部位、複製開始点、ターミネーター、エンハンサー、ポリリンカーなどを適宜含むことができる。細菌等の原核生物用や、菌類、酵母類、昆虫細胞、植物細胞、動物細胞等の真核生物用の種々の発現ベクターが市販されているし、また文献に記載されているか、または寄託

されているものについては分譲入手可能なものもあり、 それらから必要なものを入手できる。例えば、原核生物 用ベクターとしてpQEシリーズ(プロメガ)、pBluescript コシリーズ(ストラタジーン)、pETシリーズ(ノバジ ェン)、pUB110、pNU200(鵜高重三、日本農芸化学会 誌, 61:669, 1987)など、酵母用ベクターとしてpHSシリ ーズ、pXT1、pSG5(ストラタジーン)、pSVK3、pBPV (ファルマシア)など、動物細胞用としてpcDM8(フナ コシ)、pcDNAI/Amp、pREP4(インビトローゲン)な ど、昆虫細胞用としてpVLシリーズ、pBlueBaclII (イン 10 ビトローゲン)など、植物細胞用として、Tiプラスミ ド、タバコモザイクウイルスベクターなどを例示するこ とができるが、これに限定されない。勿論、必要に応じ て、市販のまたは文献記載のベクターを改変することも 可能であろう。ベクターの構築については、J. Sambroo kら(上記)に具体的に記載されており、その内容を参照 可能である。

【0027】プロモーターについても、種々のものが文献等で知られており、また市販の発現ベクターに予め組込まれているいるものもあり、これらを適宜選択し利用 20できる。例えば、原核生物用としてtrpプロモーター、lacプロモーター、Ptプロモーター、Ptプロモーターなど、酵母用としてGAPプロモーター、ADHプロモーター、GPDプロモーターなど、動物細胞用としてSV40初期プロモーター、レトロウイルスプロモーター、乳腺細胞特異的プロモーターなど、植物細胞用としてカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーターなどを例示できるが、これに限定されない。

【〇〇28】宿主細胞として、例えば原核生物としてエ

シェリシア属、セラチア属、バチルス属、シュウドモナ 30

ス属などに属する微生物、真核生物としてサッカロマイ セス属、シゾサッカロマイセス属、ピチア属などの酵母 類、ヒト胎児腎細胞、チャイニーズハムスター卵巣(C HO)細胞などの哺乳動物細胞、スポドプテラフルジペ ルダ卵巣細胞などの昆虫細胞、双子葉および単子葉植物 などを例示できるが、これに限定されない。好ましい宿 主細胞は、パチルス属、特にパチルス・ブレビス(Baci llus brevis) である。形質転換法として、以下のもの に限定されないが、塩化カルシウム法、燐酸カルシウム 法、酢酸リチウム法、エレクトロポレーション法、プロ 40 トプラスト法、スフェロプラスト法、リポフェクション 法、アグロバクテリウム法などを用いることができる。 【0029】形質転換された宿主細胞を培地中に培養 し、発現ベクターに組込まれた目的DNAを発現させ、 蛋白質精製に関する公知の方法を利用して豚丹毒菌の感 染防御ポリペプチド抗原を分離精製することができる。 ポリペプチド抗原が分泌形態で産生されたときには培地 から直接精製できるが、一方、非分泌形態で産生された。 ときには細胞を分離し、超音波処理、ホモゲナイジング 等の処理により細胞を破壊して抽出液を得、この抽出液 50 10

からポリペプチド抗原を精製することができる。精製は、溶媒抽出、塩析、脱塩、有機溶媒沈殿、限外濾過、イオン交換、疎水性相互作用、HPLC、ゲル濾過およびアフィニティークロマトグラフィー、電気泳動、等電点電気泳動などの方法を組合せて行うことができる。以下に本発明の好適実施態様について説明する。

【0030】<u>感染防御抗原遺伝子のクローニング</u>豚丹毒菌の代表的強毒株である血清型1a型のFujisawa株の染色体DNAから防御抗原遺伝子をクローニングするために、これを切断部位の多い4塩基認識制限酵素Sau3A1で不完全に消化することによってアトランダムに切断後、断片をクローニングベクタープラスミドに連結する。この組換えプラスミドをEscherichia coli

(大腸菌) に形質転換し、大腸菌の菌体内で組換え蛋白 質質を発現させる。選択培地上に発育した大腸菌のコロ ニーをニトロセルロースメンブランに転写し、メンブラ ンを豚丹毒菌に対する高度免疫血清で免疫染色する。強 く染色されるコロニーをクローニングし、発現蛋白質の ウエスタンブロットを免疫染色し陽性クローンを得る。 【0031】陽性クローンの大腸菌に組換え蛋白質を発 現させ、洗浄菌体の超音波処理上清でマウスを免疫し、 Fujisawa株攻撃に対する感染防御試験を行う。感染防御 活性を示す大腸菌クローンからプラスミドを精製し、挿 入遺伝子の一方向から100~200bpずつ削り、イ ンサートの長さの異なる変異プラスミドを作製する。こ れらのプラスミドで形質転換した大腸菌の発現蛋白質の ウエスタンブロットを免疫染色し、親株との比較から感 染防御に必要な遺伝子を特定する。この遺伝子の前後を 含む上述の親プラスミドのインサート遺伝子の塩基配列 をApplied Biosystems 373 Auto Sequencerで決定す る。ついでコンピューター解析により連続してアミノ酸 をコードするオープンリーディングフレーム (ORF) 領域を特定する。ORF中のシグナルペプチドを除く部

【0032】<u>感染防御抗原遺伝子のパチルス・ブレビス</u>での発現

分が感染防御抗原をコードする遺伝子とみなす。

バチルス・ブレビス HPD31(この菌株はバチルス・ブレビス H102(FERM BP-1087)と同一菌株である。)はタンパク質を菌体外に分泌生産し、培養液中にタンパク質分解酵素を生産しない菌株であり、遺伝子組換えの宿主菌として知られている(特公平4-74997号公報)。

【0033】本発明者らはこのパチルス・ブレビス HPD 31に豚丹毒菌の防御抗原遺伝子の一部を組み込んだ形質 転換体を作製し、この形質転換体を培養することによって豚丹毒菌の組換えポリペプチドを大量に生産する方法を今回見出した。すなわち、豚丹毒菌の防御抗原の一部のアミノ酸配列をコードする遺伝子を組み込んだパチルス・ブレビスを培養することにより、豚丹毒菌の抗原ペプチドを培養物中に生成、蓄積せしめ、これを採取する。

【0034】本発明においてFujisawa株の69kDaに相当する豚丹毒菌の感染防御抗原をコードする遺伝子として見出されたものは、配列番号1に示すアミノ酸配列(402アミノ酸)をコードするDNA、特に配列番号2に示すヌクレオチド配列を有するDNA(1206bp)である。

【0035】この豚丹毒抗原をコードするDNAを含むベクターは、宿主細胞内で複製可能なプラスミドなら如何なるものも使用できる。例えば、バチルス・ブレビスで複製可能なpUB110、pNU200(鵜高重三、日本農芸化学会誌、61、669(1987))、pHY700(S. Ebisu et al., Bio 10 sci. Biotech. Biochem., 56:812-813(1992))、pHT1 10(特開平6-133782号公報)、これらの誘導体などのプラスミドを使用できる。これらのプラスミドを構築する方法としては、公知の方法が適宜用いられ、例えばJ. Sam blookら、Molecular Cloning 2nd ed., A Laboratory M anual、Cold Spring Harbor Laboratory、1989に記載の方法などが例示される。本発明の豚丹毒抗原をコードするDNAの上流には、バチルス・ブレビス由来のプロモーター配列とシグナルペプチド配列が結合されている。 該DNAはプロモーターに作動可能に結合されているべ 20きである。

【 O O 3 6 】本発明方法において宿主細胞として用いられる細菌はパチルス・ブレビスであるが、特にパチルス・ブレビスHPD31やその変異株であるパチルス・ブレビスHPD31S-5などが好適に使用できる。宿主菌であるパチルス・ブレビスを形質転換する方法は公知の方法でよく、例えば、Takahashiらの方法(Takahashi et al, J.Bacteriol., 156:1130,1983)またはTakagiらの方法(H. Takagi et al., Agric. Biol. Chem., 53:3099-3100,1989)などが例示される。

【0037】形質転換されたバチルス・ブレビスの培養 に用いられる培地は、形質転換体が生育して豚丹毒菌ポ リペプチドを生産しうるものであれば如何なるものでも よい。該培地に含有される炭素源としては、例えばグル コース、シュークロース、グリセロール、澱粉、デキス トリン、糖蜜、有機酸などが用いられる。また窒素源と しては、カゼイン、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、 カザミノ酸、グリシンなどの有機窒素源、尿素、硫酸ア ンモニウムなどの無機窒素源などが用いられる。その 他、塩化カリウム、リン酸ーカリウム、リン酸ニカリウ ム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウムなどの無機塩が 必要に応じて培地に加えられる。栄養要求性を示す菌は その生育に必要な栄養物質を培地に添加すればよい。該 栄養物質としては、アミノ酸類、ビタミン類、核酸など が挙げられる。また、培養に際して必要があれば、培地 に抗生物質例えばペニシリン、エリスロマイシン、クロ ラムフェニコール、パシトラシン、Dーサイクロセリ ン、アンピシリン、ネオマイシンなどを加える。更に必 要により、消泡剤、例えば大豆油、ラードオ油、各種界 面活性剤などを加えてもよい。 培地の初発pHは5.0~

12

9.0、さらに好ましくは6.5~7.5である。培養温度は通常15℃~42℃、好ましくは24℃~37℃であり、培養時間は通常16~166時間、好ましくは24~96時間である。本発明で、形質転換体を前記の条件で培養することによって、培養物中に豚丹毒菌のペプチドが蓄積される。このようにして得られた豚丹毒菌抗原は公知の方法により、例えばUF膜、MF膜などを用いた膜処理、硫安分画法、クロマトグラフィーなど(蛋白質質・核酸の基礎実験法、南江堂(1985))で精製することができる。

【0038】豚丹毒菌ペプチドの回収、精製は、上記のように既知の方法を適時利用して行うが、例えば次のように実施してもよい。先ず、培養物を遠心分離またはMF膜で処理することによって菌体を除いた後、上澄液またはろ過液に硫安を加え、更にその上澄液をUF膜で濾過することにより組換え防御ポリペプチド抗原(PPA)を回収し、更に精製するために分画分子量の異なるUF膜で分画することにより精製を行うことも出来る。分画画分を更にイオン交換樹脂等により分画精製し、必要があれば凍結乾燥してもよい。このようにして得られたPPAの同定は推定分子量及び豚丹毒菌弱毒株で高度免疫したウサギの血清を用いた免疫学的同定法で決定することができる。

【0039】本発明によって、バチルス・ブレビスを宿主菌として、豚丹毒に対する防御免疫を誘導するポリペプチドを大量に生産することが可能となる。従って、上記方法によって製造される免疫原性ポリペプチドも本発明の1つである。本発明はさらに、第4の態様において、上記に規定する本発明のポリペプチドを含む豚丹毒菌感染の治療または予防用のワクチンを提供する。

【0040】PPA抗原の単回用量は、通常 $5\mu$ g以上、好ましくは $10\mu$ g以上、より好ましくは $100\mu$ g以上、特に $100\mu$ gから 1mg以上である。ワクチンには免疫を刺激するためのアジュバントを加えるのが好ましい。アジュバントとして、例えば水酸化アルミゲル、ムラミルペプチド、大腸菌の変異無毒組換え易熱性腸管毒素、ミネラルオイル、植物オイルなどのものを使用でき、免疫刺激可能な用量で配合される。但し経粘膜免疫誘導のための好ましいアジュバントは大腸菌の変異無毒組換え易熱性腸管毒素 (rmLT) である。

【0041】免疫誘導能の評価試験は、マウス、ウサギ等の実験動物及び豚を用いた既知の方法を適用して行うが、例えば次のようにしてもよい。凍結乾燥したPPAをリン酸緩衝液(PBS:pH7 2)に溶解し、ポアサイズ0.45μmのメンブランで濾過滅菌後、公知の家畜用市販アジュバントと等量混合したものを注射用サブユニットワクチンとして供する。ここで使用するアジュバントは水酸化アルミゲル、カリミョウバン、ミキラルオイル、植物オイルなどでよい。アジュバントと等量混合した抗原を動物の皮下、皮内または筋肉内に2~3週間隔で2回注射し、2回目注射の1週以降に豚丹毒菌

強毒株で皮下または皮内攻撃する。攻撃後2週間にわたり生死を観察するか、1週後に安楽死させて、臓器中の豚丹毒菌の存在(感染の有無)を培養検査で確認する。また免疫動物の血清中の免疫抗原に対する特異抗体価をPPAを抗原としたELISA法により検出する。また免疫動物の血清を腹腔内に注射したマウスに2時間後にFujisawa株またはその他の血清型の豚丹毒菌強毒株を皮下接種攻撃し発病・致死防御能から判定する受け身感染防御試験により、ワクチン免疫動物の血中防御抗体レベルを評価する。

【0042】豚丹毒菌組換え抗原による経粘膜免疫誘導 は、マウスにおいて粘膜アジュパント作用が知られてい る豚由来大腸菌の腸管易熱性腸管毒素(LT)の遺伝子 変異組換え体と豚丹毒菌組換え抗原との混合溶液を、経 口投与、非経口投与(静脈内投与、動脈内投与、筋肉内 投与、経皮投与、直腸投与、鼻腔内投与等の経皮膜投与 など)によって行うことができる。特に鼻腔内等の経皮 膜に噴霧・注入することで十分な免疫能を得ることがで きることは注目されるべきである。本発明で用いたLT は、LTの毒性発揮に必要なAユニットのA1フラグメ ントとA2フラグメントの連結部位のトリプシン作用部 位 (Arg 192-Thr 193-Ileu 194) を 欠失させた弱毒化変異体(mLT)の組換えmLT(rm LT)を用いる。rmLTの製法はTsujiらの方法(Immunolog y, 90:176-182, 1997) に従った。すなわちLT-AのX balーEcoRIフラグメントをBluescrip tllsK+-1ベクターに連結し、PCRの鋳型として 使用する。変異毒素作製のためにはAユニットの3アミ ノ酸部分の塩基配列を欠失させた2種類のPCRプライ マーを用いて、PCR産物を得、これをLT遺伝子を含 30 むプラスミド(EWD299)のXbal-EcoRI サイトに連結し、pTSU135を得た。このプラスミ ドを宿主大腸菌MV1184に形質転換させ、その組換 え大腸菌をCAYE培地(カザミノ酸、酵母エキス、リ ンコマイシン添加培地)を37℃、24時間振とう培養 し、集菌した菌を超音波処理し、その上清に70%濃度 に飽和硫安を加えて沈殿を得る。沈殿に含まれるrmL Tの精製はTsujiの方法 (Microbiology, 143, 1797-1804, 1997)に従って行うことができる。すなわち、硫安沈殿 物をTEAM緩衝液 (Tris-EDTA, Azide, NaCl)に溶解・ 透析後、ローガラクトースカラムにアプライし、TEA N緩衝液で洗浄後、カラムに結合したrmLTをO.3 Mガラクトースで溶出する。mLTは、ADPリボシル トランスフェラーゼ活性を欠いており、マウスに対する 下痢原性を減少している。調製したrmLTは冷暗所に 溶液状態で保存すれば、動物に対する粘膜アジュバント 活性は1年間以上維持している。

【0043】粘膜経路での免疫方法としては、豚丹毒菌 組換え抗原と適量のrmLTとの混合液をマウス、ウサギ、 ブタの鼻腔内に一定間隔で2回注入または噴霧し、鼻 14

汁、唾液、血清中の豚丹毒菌組換え抗原に対する特異的 抗体レベルをELISA、ウエスタンブロッテイング及 びマウス受け身感染防御試験により測定する。さらに、 免疫動物に対しFujisawa株または他の血清型の豚丹毒強 毒菌株生菌を皮下経路で攻撃接種し、発病・致死に対す る防御能から免疫効果を評価する。

【0044】従って、本発明には、上記ワクチンを、豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性のある動物 (ヒトを除く)に投与することを含む、豚丹毒菌感染を治療または予防する方法も包含される。抗原刺激すなわち免疫は、アジュバント含有ワクチンで初回免疫後、通常2週間以上の間隔でアジュバント非合有ワクチンでさらに1回~数回免疫して行うことができる。

【0045】この場合、本発明のポリペプチドに対する 抗体(ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体)で受 動免疫することも可能である。そのための抗体は、免疫 しようとする動物と同種または異種の動物にポリペプチ ド抗原を接種して得られた抗血清、あるいは、その抗血 清から抗原吸収等により精製したIgG抗体であってよ い。また、周知のモノクローナル抗体作製法に従って調 製された該ポリペプチド抗原に対するモノクローナル抗 体であってもよいが、好ましくは上記ポリクローナル抗 体である。

【0046】本発明はさらに、上記に規定したポリペプチドまたは抗体の、ワクチン接種動物または移行抗体を保有する幼若動物の豚丹毒菌感染の検出への使用を提供する。検体の種類は以下のものに限定されないが、血液、尿、唾液、糞便、脳脊髄液、細胞、組織等である。検出は周知の方法で行うことができ、例えば凝集反応を利用する方法、沈降反応を利用する方法、標識抗体を利用する方法(例えば蛍光抗体法、酵素抗体法、ラジオイムノアッセイなど)などによって行うことができる。以下本発明を実施例により更に詳しく説明するが、これは例示的なものであり、本発明はこれに限定されるものではない。

[0047]

【実施例】豚丹毒菌Fujisawa株の防御抗原遺伝子のクローニング、同遺伝子の一部のバチルス・ブレビス用発現ベクターの構築方法及び培養菌液からの精製方法(実施例1~4)及び動物で免疫評価試験(実施例4~7)に関する実施例をあげて、本発明をより詳細に説明する。【0048】実施例1

豚丹毒菌の感染防御抗原遺伝子のクローン化

感染防御抗原遺伝子のクローニングには、豚に敗血症を起こし最も強毒である血清型1aのFujisawa株の染色体DNAを使用した。染色体DNAはリゾチームとアセチルムラミダーゼで前処理した菌体を、プロテイナーゼKとSDS処理により溶菌し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールで除蛋白質後、エタノール沈殿し

て精製した。染色体DNAは4塩基認識制限酵素 Sau3A |で不完全に消化し、これを10~40%シュークロース密 度勾配遠心にかけ、フラクション分画した。クローニン グし易い2~8 Kbの断片を含む分画をプールし、制限酵 素BamHlで切断し脱リン酸化したpBluescript IIにライ ゲーションした。これを大腸菌XL1-Blueのコンピーテン トセルに形質転換し、100 μ g/mlのアンピシリン添加し -寒天培地に拡げ、37℃で一夜培養した。このコロニ ーを、予め10 mM IPTGに浸し乾燥させた寒天培地大の二 トロセルロースメンブランに転写し、コロニー面を上に 10 して新しいアンピシリン添加L-寒天培地におき、37 **℃で5時間培養して組換え蛋白質を発現させた。このコ** ロニーブロットを飽和クロロホルム蒸気で殺菌し、リゾ チーム、DNaseパッファーで処理し豚丹毒菌で高度免 疫した豚抗血清で免疫染色した。強く染色されたコロニ ーをマスタープレートからクローニングし、免疫ブロッ ティングで発現蛋白質の解析を行った。その結果、4種 類の抗原発現型が認められた。また、これら4種類の抗 原発現型のクローンからプラスミドを調製し、インサー トのサイズ、制限サイトの解析を行った。その結果、4 種類の発現型クローンはそれぞれの型に特有のインサー トを持っていた。そこで、4種類の発現型クローンの各 代表株 1 株を用いて蛋白質発現を行い、組換え大腸菌を 超音波処理して組換え蛋白質を溶出させた。

【OO49】この超音波処理上清中の蛋白質500 μgをフ ロイントの不完全アジュバントと混合し、マウスの感染 防御試験を行った。その結果、 XL1-Blue (pA) とXL1-Blu e(pB)の2クローンにマウス感染防御活性が認められ た。XL1-Blue (pA) 群は1/4匹が生残し、3/4匹が1~2日 の死亡遅延を示し、XL1-Blue(pB) 群は2/4匹が1/4匹が3 30 日の生残し、死亡遅延を示した。pBは3.8 Kbの、pAは1. 7 Kbのインサートを持っていた。サザンバイブリダイゼ ーションの結果、pAとpBは共通のインサート部分を有し ていた。組換えプラスミドのインサートを一方の端から 段階的に削って短くし、変異株を作製するExo-Mung Del etion法により、感染防御活性の発現に必要な領域を解 析した。その結果ある程度以上インサートが短くなると 抗原が発現されなくなり、抗原の発現に必要な領域はpA のpBluescriptのマルチクローニングサイト上のNot 「サ イト側から1~1.1Kbと考えられた。

【0050】次に、抗原の発現に必要な領域とその前後 計2.814 bpの塩基配列を決定した(図1)。その結果、 感染防御抗原をコードしている1,881 bpの領域が見つか った(図2)。pBは防御抗原遺伝子の全長を保有し、pA は防御抗原遺伝子の3'側584bpを欠いていた。感染防御 活性の発現に必要な1~1.1Kbの領域は、pAインサート の5' 寄りにあるKpn |サイトと3' 末側のpBluescriptのマ ルチクロ―ニングサイト上のKpn |サイトで切り出せる 1,029bpの断片と大体同じと考えられた。なお、感染防 御抗原はシグナルペプチドを持っていたことから、この 50

抗原は前駆体として翻訳され、シグナルペプチダーゼに より切断された後、成熟型蛋白質として細胞膜の外に輸 送されることがわかった。成熟型蛋白質の推定分子量は 68. 9kDaで、豚丹毒菌が産生するインタク トな本抗原の 分子量と一致した。この抗原のC末にはStreptococcus やClostridiumなどのグラム陽性菌の菌体表層蛋白質の 細胞壁への結合に必要と考えられている、20個のアミノ 酸を1配列とした8個の繰り返し配列構造が認められ た。感染防御活性の発現に必要と考えられたpAの1,029 bpのKpn 1断片は、成熟型蛋白質の61~402番目のアミノ 酸計342個をコードし、繰り返し配列構造は全く含んで いなかった。

【OO51】pAの1,029 bpのKpn I断片を、組換え蛋白 質の発現と精製に適した6xHisベクタープラスミドpQE32 のKpn |サイトにサブクローニングした。pQE32組換えプ ラスミドはpA1.0とした。pA1.0を持つ組換え大腸菌にヒ スチジンヘキサマー (6xHis) と感染防御領域との融合 蛋白質を作らせ、6Mグアニジンパッファー(pH 8.0)と 8 Mウレアバッファー(pH 8.0~4.5) を用いた変性下で ヒスチジンヘキサマーとニッケルカラムとの親和性を利 用してアフィニティー精製した。融合蛋白質は6xHis1.0 とした。精製した6xHis1.0についてマウス感染防御活性 をみた。1匹あたり50μgをフロイントの不完全アジュ パントと混合し、マウス各群5匹を1回皮下免疫した。 免疫3週後に100LD50のFujisawa株で皮下攻撃し、 10日間観察した。3/5匹が生残し、2/5匹が1~3日の 死亡遅延を示した。そこで、精製した6xHis1.0をフロイ ントのコンプリートアジュバントと混合し、豚を用いて 感染防御活性を確認した。1回につき100μgあるいは50 0μgの6xHis1.0を4週齢の検定豚各群2頭に3~4週間 隔で2回筋肉内注射して免疫した。対照群各群2頭はア ジュバントだけで免疫した。Fujisawa株4×107CFUの皮 内攻撃により、対照群2頭は3日および4日後に敗血症 死したが、100 μgおよび500 μg免疫群は無症状で耐過 し、1週後の各臓器からの菌分離でも豚丹毒菌も分離さ れず、完全に感染防御された。100 µg免疫群について血 清型2bの82-875株8×10<sup>7</sup>CFUの皮内攻撃に対する交差感 染防御も調べたところ、対照群2頭は急性敗血症あるい は全身に菱形疹を示し、1週後の菌分離では臓器や皮膚 病変から攻撃菌が分離されたが、免疫群は無症状で耐過 し、菌分離も陰性で完全に交差感染防御が成立した。

【0052】<u>実施例2</u>

40

<u>豚丹毒菌の感染防御抗原蛋白質質遺伝子のサブクローニ</u>

# (1) 大腸菌へのクローニング

図1に示した2,814bpを含む約3.8kbのインサートを含 むプラスミド(実施例 1 で作製したpB) をテンプレート にして合成した2種類のプライマーERM1 (図3、配列番 号3)、ERRV1(図3、配列番号4)を用いて豚丹毒菌 の感染防御抗原蛋白質質遺伝子(図2)の一部(EN1)遺

伝子 (en1:図2の268~1,293番目までのポリヌクレオ チド:1,026bp) をPCR法で増幅した。同様に2種類のプ ライマーERM2 (図3、配列番号5)、ERRV1 (図3、配 列番号4)を用いて、en1遺伝子よりさらに180bp長い豚 丹毒菌の感染防御抗原蛋白質質の一部 (EN2) 遺伝子(en 2:図2の88~1,293番目までのポリヌクレオチド:1,206 bp) をPCR法で増幅した。en1遺伝子の取得には、プライ マーERM1とプライマーERRV1を、en2遺伝子の取得にはプ ライマーERM2とプライマーERRV1を各々100 pmol、Tagポ リメラーゼ2.5単位、dNTP200 μM、pSKW2鋳型DNA1 ng、 100 μ | Taq緩衝液 (10 mMトリス-塩酸 (pH 8.5) 、2.5 mM Mg<sup>2+</sup>、50 mM 塩化カリウム、100 μg/mlウシ血清ア ルブミン)を混合し、96℃で30秒保持した後、DNAの熱 変性(94℃、60秒)、プライマーのアニーリング(54 ℃、60秒)、プライマーの伸長(70℃、60秒)を25サイ クルさせることによって増幅させた。遺伝子en1 (1026 bp)とen2 (1206 bp) を、0.8 %アガロースゲル電気泳 動に供し、断片を回収した。プラスミドpT7 Blue(Nova gen社製) と先に得たen1遺伝子、en2遺伝子断片をT4DNA リガーゼを用いて連結した。連結DNAを大腸菌 JM109に 形質転換し、アンピシリン50mg/ml含有LB寒天培地(1.0) % Tryptone, 0.5 % Yeast Extract, 1.0 % NaCl, 1.5% 寒天、pH 7.0) に塗布して、アンピシリン耐性を持つ株 を選択した。選択株よりプラスミドを抽出してen1遺伝 子、en2遺伝子を保持するプラスミドpT7 Blue en1、pT7 Blue en2を得た。また、ここで得た株をE. coli JM109 /pT7 Blue en1、E. coli JM109/pT7Blue en2とした。 【0053】(2) パチルス・ブレビスへのクローニン

Bacillus brevis PNH300TP17 (FERM BP-5641)をNco Iと 30 Bam HIで処理した後、0.8%アガロースゲル電気泳動に 供して4.0 kbの断片を回収した。さらに、pT7 Blue en 1、pT7 Blue en2をNco IとBam HIで処理した後、0.8% アガロースゲル電気泳動に供して1026 bpのen1遺伝子断 片と1206 bpのen2遺伝子断片を回収し、それぞれを先に 得た4.0 kbの遺伝子断片とT4 DNAリガーゼを用いて連結 した。連結DNAを用いてパチルス・ブレビス HPD31-S5 (FERM BP-6623) をエレクトロポレーション法(Agric. Biol. Chem., 53, 3099-3100 (1989))で形質転換し、 ネオマイシン 50 mg/ml含有TM寒天培地 (1 %ペプト ン、0.2 %酵母エキス、0.5 %肉エキス、1 %グルコー ス、0.001 %FeSO4・7H2O、0.001 %MnSO4 · 4 H2 O、0.0001% Z n S O4 · 7 H2 O、1.5 % 寒 天、pH 7.0) に塗布をして、ネオマイシン耐性を持つ 株を選択した。選択株よりプラスミドを抽出してそれぞ れen1遺伝子、en2遺伝子を保持するプラスミドpNH300 e n1、pNH300 en2を得た(図5)。また、ここで得た株を バチルス・ブレビス HPD31-S5/pNH300 en1、バチルス・

18

ブレビス HPD31-S5/pNH300 en2とした。 【0054】<u>実施例3</u>

#### 形質転換体の培養

バチルス・ブレビスHPD31-S5/pNH300 en1、バチルス・ブレビスHPD31-S5/pNH300 en2を中試験管を用いてネオマイシン 50 µg/ml含有TM液体培地3 mlで30℃で2日間振とう培養を行い、その培養上清をSDS-PAGEにより解析を行った。EN1 (HPD31-S5/pNH300 en1培養から得られたPPA)及びEn2 (HPD31-S5/pNH300 en2培養から得られたPPA)の推定分子量は、それぞれ40050Da、465564Daであり、それぞれが相当の分子量の位置に染色バンドを示した。以後、EN1は40kPPA、E2は46.5kPPAと呼ぶ。バンドの濃さより40kPPA分泌生産量は約2 mg/I、46.6kPPAの分泌生産量は約500 mg/Iと定量した。すなわち46.5kPPAは、40kPPAに比べて約250倍の生産量を示した。図6は40kPPA及び46.5kPPAの精製工程とPAGE及びウエスタンブロッテイング像である。

【0055】実施例4

## 形質転換体の大量培養及び精製

(1) パチルス・ブレビスHPD31/pNH300 en2の大量培養 及び46.5kPPAの精製

バチルス・ブレビスHPD31/pNH300 en2を30リットル (L) のジャーファメンターを用いてネオマイシン 50 μg/ml含有TM液体培地にて30℃で3日間振とう培養を行 い、その培養上清をSDS-PAGEおよびマウス豚丹毒菌モノ クローナル抗体を用いたウエスタンブロット法により解 析を行った。解析の結果、46.5 kDaの大きさのEN2蛋白 質質が400 mg/L培地中に生産されている事が確認され た。パチルス・ブレビスHPD31/pNH300 en2の培養液18を ポアサイズ0.45μmのペリコンカセット膜(ミリポア 社)を用いて除菌し、約20Lの培養上清液を得た。次に 培養上清液のpHを4.75にし、ポアサイズ0.45μmのペリ コンカセット膜(ミリポア社)を用いて濃縮を行った。 pH 4.75の20 mM 酢酸パッファーを5 L加水し、濃縮液を 回収した。この溶液をpH 8.0に調製し、DEAEトヨパール 650M (東ソー株) 500mlを充填したカラムに通し、0 M NaCl 20 mMTris-HCl (pH 8.0)から0.5 M NaCl 20mM Tri s-HCl (pH 8.0)のリニアグラジエントカラムクロマトグ ラフィーを行い、46.5kPPAを100 mM NaCl 画分に溶出し た。溶出した200 mlの精製EN液を分画分子量10,000のミ ニタンカセット膜(ミリポア社)を用いて濃縮し、超純 水を加水することにより脱塩を行った。濃縮液の46.5kP PAを回収し、凍結乾燥を行い精製粉末3.6 gを得た。46. 5kPPAの純度は80%で、培養液からの回収率は45%であ った(表1)。

[0056]

【表1】

19

豚丹毒菌 46.5kPPA の精製段階における濃度と回収率

精製段階	容積(L)	微度(mg/L)	46.5kPPA 量(g)	回収率(%)
培養上清	20	400	8.0	100
pH 沈澱	5	1000	5.0	63
DEAE カラムクロマト	0.2	20000	4.0	50
凍結乾燥	-	· <u> </u>	3.6	45

【 O O 5 7 】 (2 )バチルス・ブレビスHPD31/pNH300 e n1の大量培養及び精製

同様の方法で、40kPPAも大量培養、精製を行ったが、生産性が低く、回収率は極めて悪かった。

【0058】実施例5

<u>精製40kPPA及び46.5kPPAによるマウス及びウサギを用いての感染防御免疫能評価</u>

供試したマウスは6~7週齢の雌のddYマウス、またウサギは3ヵ月齢の日本白色種であった。先ず、精製PPAはマウスを用いて強毒菌に対する防御免疫能を評価した。凍結乾燥した40kPPA及び46.6kPPAをPBSに溶解し、等量の公知の豚ワクチン用O/Wアジュバント(流 20動パラフィン0.45ml、乾燥水酸化アルミゲル3.00mg、マンナイドモノオレート0.05ml、ポリソルベート80 0.018ml、塩化ナトリウム2.975mg、りん酸水素ニナトリウム15.15mg、リン酸水素ナトリウム・二水2.83mg、エチルメチルクリチオサルチル酸ナトリウム0.15mg、蒸留水で2mlとする)と等量混合し、タッチミキサーで1分間撹拌した。これをマウスに2週間間隔で2回0.1mlづつ皮下注射し、その1週後に100LD50のFujisawa株で皮下攻撃し、2週間にわたり生死を観察した。30

【0059】46.5kPPAは1µgで50%以上の防御率を 示したが、40PPAは100 µ g 以上で50%以上の防御率を示 し、46.5kPPAは、生産量とどもに防御免疫誘導能も40kP PAに比べて優れることが判明した(表2)。そこで以降 のウサギ及びブタでの免疫評価試験には46.5kPPAのみを 用いた。ウサギに対し、46.5kPPAを1~100μg量を マウスの免疫方法に準じて調製したアジュバント添加ワ クチンを筋肉内注射し、2回目注射2週後の血清につい て、受け身感染防御活性をみた。受け身感染防御試験 は、免疫血清をマウスの腹腔内に注射し、その3時間後 に100LD50のFujisawa株で攻撃し、2週間生死を観 察した。46.5kPPAで免疫したウサギ血清をO.5ml投 与したマウスは50%以上の防御率を示した(表3)。 以上の成績から、46.5kPPAが防御免疫に関与する抗体を 誘導する能力が優れていることが判明した。また、Ma k i n o らが防御に必要としている C 末の繰り返し配列 は防御免疫誘導能には必須でないことが明らかとなっ た。オイルアジュバントと混合した46.5kPPAは、冷暗所 に保存すれば、1ヶ月上は調製直後の免疫力価を維持し ている。

20

[0060]

【表2】

豚丹毒菌 46.5kPPA のマウスにおける感染致死防御免疫誘導能

-		免疫抗原	
٠.		46. 5kPPA	40kPPA
攻撃株	免疫量(μg)	生残数/攻擊数	生残数/攻撃数
Fujisawa	100	10/10	7/10
(1型)	10	10/10	3/10
	1	9/10	0/10
	0.1	0/10	0/10
SE9	100	10/10	5/10
(2型)	10	10/10	2/10
	· 1	8/10	0/10
	0.1	0/10	0/10

[0061]

【表3】

豚丹市菌 46.5kPPA (10μg)で免疫したウサギの血清によるマウス受け身感染防御能

攻撃菌株	投与血治量	筋肉注射免疫ウサギ血清 (ml)生残数/攻撃数	経鼻免疫ウサギ血流 生残数/攻撃数
Fujisawa	0.5	8/10	7/10
(la型)	0.1	2/10	6/10
	0.02	0/10	0/10
SE9	0,. 5	7/10	9/10
(2型)	· O. 1	3/10	1/10
	0.02	0/10	0/10

## 【0062】 実施例6

# 豚における46、5kPPAを用いた感染防御能生評価

### (1) 筋肉内注射免疫による評価

供試した豚は、豚丹毒ワクチン非接種の母豚から生まれ た5~6週齢の子豚であった。精製46.5kPPAをPBSに 溶解後、実施例5で記した方法に準じて等量のO/Wア ジュバントと混合し、4週齢の子豚に2週間間隔で2回 筋肉内注射した。これらの免疫豚に追加免疫3週後にFu jisawa株の1×108で皮内攻撃し、2週間にわたり臨床 20 症状(体温、皮膚の発疹、元気食欲、生死)を観察し、 また2週間後の殺時に臓器(心臓、脾臓、肝臓、腎臓、 骨髄)からの豚丹毒菌の分離培養を行った。その結果、 100μg以上の免疫群の100%が発病を防御し、ま たこれらの免疫豚の臓器からは豚丹毒菌は全く分離され なかったことから感染防御効果を確認できた(表4)。

[0063]

【表 4 】

豚丹毒菌 46.5kPPA(100μg)で筋肉注射免疫した豚の感染・発病防御免疫誘導能

免疫量(μg) 1000 100	発病/攻撃頭数	菌分離頭数/攻擊頭数
1000	0/3	0/3
100	0/3	0/3
10	1/3	1/3
0	3/3	3/3

【0064】(2)経鼻噴霧免疫による評価 46.5kPPA抗原2000μgをrmLTの80μg、400μ 30 gまたは2000μg/mIPBSと等量混合し、豚の 鼻腔内に1m!づつ2週間で2回噴霧注入し、追加免疫 3週後にFujisawa株の1×108で皮内攻撃し、2週間に わたり臨床症状(体温、皮膚の発疹、元気食欲、生死) を観察し、また2週間後の殺時に臓器からの豚丹毒菌の

46. 5kPPAに 4 O O μ g / m I 以上 分離培養を行った。 のmLTと混合したものを経鼻投与した豚群は、Fujisa wa株の攻撃接種に対し発病防御を示し、また臓器からの 菌分離も陰性であり感染防御効果を確認できた(表 5)。

[0065]

【表5】

豚丹霉菌 46.5kPPA (1,000μg) と rmLT との混合物で経鼻免疫した豚の 感染発病防御試験

mLT量 (μg)	発病/攻撃頭数	菌分離頭数/攻擊頭数
2000	0/3	0/3
400	0/3	0/3
8 0	2/3	3/3
0	3/3	3/3

# 【0066】<u>実施例7</u>

46. 5kPPAで免疫した豚の血清のマウスでの受け身感染防 御能及びELISA抗体価

免疫豚の血清のマウス受け身感染防御試験ならびに血清 および鼻汁中の46.5kPPAに対するELISA抗体価の測定を

行った。免疫豚血清を用いた受け身感染防御試験は実施 例5の記載に準じて行った。筋肉内注射免疫豚血清(表 4の46. 5kPPA 100 μ g免疫豚群の追加免疫1週後のプール 血清) および経鼻噴霧免疫豚血清 (表5の46 5kPPA 1000 μg + mLT 400μg免疫豚群の追加免疫1週後のプール血

清)はともに0.5ml以上を投与したマウスにおいて、Fujisawa株攻撃に対し100%の防御率を示した(表6)。また、筋肉内注射免疫豚および経鼻免疫豚の経過血清中の46.5kPPA抗原に対する特異ELISA抗体価(血清は1gG抗体価を、鼻汁は1gA抗体価を示す。)を表7および表8に示す。ELISA抗体価の測定法には、96穴のマイクロプレートの各ウエルに1μgの46.5kPPAを加え、4℃で一夜静置後、3%ゼラチンでブロッキングした反応用プレートを用いた。反応用プレートに500倍希釈豚血清を加え、25℃で90分間反応後、0.1%Tween 20添加PBSで洗りし、これに抗豚1gGペルオキシダーゼ標識抗体を加え、上記同様に反応させ、洗浄した。最後に発色基質液を加え暗所で10分間反応後、3N硫酸液を加え、450nmに

おける吸光度を測定し、ELISA抗体価とした。なお、鼻 汁液のELISA抗体価測定には、綿棒で採取した鼻腔拭い 液を1mlのPBSですすぎ、その上清を5倍希釈したものを 用い、抗豚IgAペルオキシダーゼ標識抗体を用いた以外 は血清と同様の方法で反応を行った。筋肉内注射免疫し た豚の血清ELISA抗体価は2回目免疫1週後に急激な上昇 を認め5週後までほぼ高いレベルを維持した。経鼻噴霧 免疫豚でも、追加免疫1週後に血清抗体価の急上昇と鼻 汁中でのIgA抗体価の上昇が認められ、5週後まで高レベ ルを維持した。

24

【0067】 【表6】

豚八苺菌 46.5kPPA 免疫豚の血清によるマウス受け身感染防御能

(撃菌株	投与血清量(m	筋肉注射免疫豚血清 1)生残数/攻撃数	経鼻免疫豚血清 生残数/攻撃数
ıjisawa	0. 5	10/10	10/10
(la型)	0.1	3/10	4/10
	0.02	0/10	0/10
E9	0. 5	10/10	10/10
2型)	0.1	4/10	2/10
	0.02	1/10	0/10

[0068]

-【表7】

豚丹毒菌 46.5kPPA 筋肉注射免疫豚の血清及び鼻汁中の ELISA抗体価

				免疫後	週数		
	免疫量						
豚番号	(μg)	0	1	2	3	4	5
41 .	1,000	0.12	0. 23	0.53	1.53	1.74	1.84
4 2	1,000	0.04	0.34	0.90	1.73	1.50	1.65
4 3	1,000	0.06	0.16	0.49	1.38	1.23	1.49
44	100	0.05	0.24	1.22	1.45	1.44	1.35
4 5	100	0.08	0. 15	0.83	1.70	1.94	1.68
46	100	0.14	0. 17	0.45	1.72	1.65	1,80
4 7	10	0.05	0. 05	0.94	1.72	1.33	1.24
48	10	0.01	0, 03	0,63	1.48	1.32	1.33
49	10	0.03	0,04	0.70	1.15	1.27	1.04
5 0	0	0.04	0.03	0.14	0.12	0.10	0.18
5 1	0	0.14	0.02	0.13	0.15	0.17	0.15
5 2	· O	D. 02	0.12	0.10	0.07	0. 11	0.13

[0069]

【表8】

豚丹毒菌 46.5kPPA 経鼻噴霧免疫豚の血清及び鼻汁中の ELISA抗体価

		免疫後週数									
	⊒T 量	ų	1清(100	倍希釈)	4	\$計(5台	——— 音希釈)				
<b>承番号</b>	(μg)	0	2	. 5	· O .	2	. <b>5</b>				
61	2,000	0.12	0.32	1.28	0.13	0.16	0.38				
62	2,000	0.11	0.21	1.48	0.08	0.14	0.83				
63	2,000	0.06	0. 22	1.95	0.03	0.32	0.46				
64	400	0.12	0. 24	1.34	0.04	0.26	0. 55				
65	400	0.14	0.11	1.58	0.07	0.17	0. 76				
66	400	0.18	0.'20	1.64	0.03	0.18	0.55				
67	80	0.04	0.11	1.54	0.04	0.09	0.80				
68	80	0.03	0.13	1.82	0.07	0.14	0.75				
69	80	0.06	0.14	1.69	0.02	0.26	033				
70	0	0.03	0.12	0.32	0.05	0.14	0.25				
71	0	0.13	0.08	0.27	0.11	0.13	0.13				
72	oʻ	0.10	0.12	0.21	0.15	0.12	0.19				

# [0070]

【発明の効果】豚丹毒菌1型菌強毒株Fujisawa株の69kDa(597アミノ酸から成るポリペプチド)の感染防御抗原ついて、2型菌Tama96株では防御抗原(64kDa)の防御活性に必須とされているC末の20アミノ

酸の繰り返し配列を含む195アミノ酸を除去したN末 側から402アミノ酸をコードする1206bpを用い てバチルス・ブレビスを宿主細胞として、形質転換体を 作製し、同形質転換体で分泌発現させた46.5kDaの組換 えポリペプチドを抗原として使用し、その免疫により強 力な防御免疫が誘導されることを見いだした。またバチ ルス・ブレビスを宿主とする形質転換体の培養液から、 高収量で当該ポリペプチドを非融合状態で容易に精製す る方法を確立した。この方法で得た46.5kDaの組換えポ リペプチドを動物に筋肉・皮下・皮内に注射することに 10 より、あるいは大腸菌の組換え変異易熱性腸管毒素(rm LT) との混合物を経鼻投与することにより強毒豚丹毒菌 の攻撃に対し感染・発病を完全に防御することができ た。本発明による46.5kDaのポリペプチド (Protective polypeptide antigen:PPA)の感染・発病防御免疫誘導活 性の証明は本発明において最初になされたことである。 また豚丹毒菌組換え抗原の非融合状態での生産方法の確 立も本発明において最初になされたことである。組換え 抗原による豚での経鼻免疫法による感染防御免疫誘導方 法に関しても最初である。以上のことから、本発明は豚 20 丹毒に対する筋肉・皮下注射型サブユニットワクチン及 び経粘膜投与型サブユニットワクチンの実用化に貢献す

るものである。本発明により、以下の作用効果が達成可 能である。

【0071】1)ヒスチジンポリマーのような精製用融 合ペプチドとの融合させない状態での豚丹毒菌の組換え 防御抗原の効率的生産・精製技術の発明は、豚丹毒菌の 診断用及び予防用の組換え抗原の工業規模での生産を可 能とする。

2) 本発明技術で得られた高純度の46.5kPPAは、豚用ワ クチンとして認可されているアジュバントとの併用で、 動物に対し感染防御免疫誘導の有効性と副作用を認めな い安全性が確認できたことから、組換え豚丹毒サブユニ ットワクチンとしての実用性が期待できる。

【0072】3) 46.5kPPAはrmLTとの組み合わせで鼻腔 噴霧・注入により免疫効果が得られたことから、従来の ワクチンでは困難であった経粘膜投与型ワクチンの開発 に貢献できる。また他の病原体微生物の家畜用経粘膜投 与型ワクチンの開発にも利用できる。

4) パチルス・ブレビスを利用した豚丹毒菌抗原の分泌 生産系の確立は、他種病原微生物の組換えサブユニット ワクチンの生産技術への利用が期待できる。

[0073]

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Animal Health, the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: Higeta Shoyu Co., Ltd.; and Fujita Gakuen

<120> Recombinant subunit vaccines against Erysipelothrix rhusiopathiae

<130> P99-0165

<170> PatentIn Version 2.0

<210> 1

<211> 402

<212> PRT

<213> Erysipelothrix rhusiopathiae

<400> 1

Asp Ser Thr Asp IIe Ser Val IIe Pro Leu IIe Gly Glu Gin Val Gly

Leu Leu Pro Val Leu Pro Gly Thr Gly Val His Ala Gln Glu Tyr Asn

25

Lys Met Thr Asp Ala Tyr lle Glu Lys Leu Val Ser Leu lle Asn Gln

Lys Val Lys Pro Phe Leu lle Asn Glu Pro Lys Gly Tyr Gln Ser Phe 55

Glu Ala Val Asn Glu Glu lle Asn Ser lle Val Ser Glu Leu Lys Asn 65 75

70

Glu	Gly	Met	Ser	Leu 85	Gln	Asn	He	His	His 90	Met	Phe	Lys	Gln	Ser 95	lle
Gin	Asn	Leu	Ala 100-	Thr	Arg	lle	Gly	Tyr 105	Arg	Ser	Phe	Met	Gln 110	Asp	Ala
Met	Tyr	Leu 115	Glu	Asn	Phe	Glu	Arg 120	Leu	Thr	liė	Pro	Glu 125	Leu	Asp	Glu
Ala	Tyr 130	Val	Asp	Leu	Leu	Va I 135	Asn	Tyr	Glu	Val	Lys 140	His	Arg	lle	Leu
Va I 145	Lys	Tyr	Glu	Gly	Lys 150	Vai	Lys	Gly	Arg	Ala 155	Pro	Leu	Głu	Ala	Phe 160
He	Val	Pro	Leu	Arg 165	Asp	Arg	He	Arg	Ser 170	Met	Asn	Glu	lle	Ala 175	Ala
Glu	Val	Asn	Tyr 180	Leu	Pro	Glu	Ala	His 185	Glu	Asp	Phe	Leu	Val 190	Ser	Asp
Ser	Ser	Glu 195	Tyr	Asn	Asp `	Lys	Leu 200	Asn	Asn	lle	Asn	Phe 205	Ala	Leu	Gly
Leu	Gly 210	Val	Ser	Ģlu	Phe	lle 215	Asp	Tyr	Asn	Arg	Leu 220	Glu	Asn	Met	Met
225				His	230					235					240
Asn	Arg	GIn	He	Gin 245	Val	Val	Arg		Va I 250	Tyr	Pro	Asn	Leu	Glu 255	Arg
Ala	Asn	Ala	Va I 260	Val	Glu	Ser	Leu	Lys 265	Thr	He	Lys	Asp	11e 270	Lys	GIn
Arg	Gly	Lys 275	Lys	Leu	GIn	Glu	Leu 280	Leu	Glu	lie	Tyr	11e 285	Gln	Arg	Ser
Gly	Asp 290	Val	Arg	Lys	Pro	Asp 295	Val	Leu	Gin	Arg	Phe 300	He	Gly	Lys	Tyr
305				Asp	310	•			-	315					320
Ser	Asp	He	Phe	Asp 325	Ser	Tyr	Ser	Val	Asp 330		Glu	Lys	He	Arg 335	Asn
Lys	Glu	He	Thr 340	Leu	He	Asn	Arg	Asp 345	Ala	Tyr	Leu	Ser	Met 350	lie	Tyr
Arg	Ala	GIn 355	Ser	lle	Ser	Glu	11e 360	Lys	Thr	lle	Arg	Ala 365	Asp	Leu	Glu
	370			Ser		375					380		•		
Pro 385 Lys		Ser	Pro	Val	Lys 390	Val	Glu	Lys	Pro	Va I 395	Asp	Glu	Glu	Lys	Pro 400
<210	> 2														
	> 12	206													
	> DN														
<b>SZ13</b>	> Er	ysıp	elot	hrix	rhu	is i op	athi	ae							

ttacctggga caggggtaca tgctcaggaa tacaacaaaa tgactgatgc ttatattgaa aaattggtat ctctaattaa tcaaaaagtg aagccgtttc ttataaatga gccaaagggg taccaaagtt togaagcagt gaatgaagag attaactoga ttgtaagtga acttaaaaat gaaggaatga gtottoaaaa cattoaccat atgtttaaac aaagcatoca aaacctagca actagaatcg gctacagaag ttttatgcag gatgctatgt atcttgaaaa ttttgaaaga ttaacgattc ctgaacttga tgaagcatac gttgatttac tcgtgaatta cgaggtgaaa caccgtattt tagtaaaata tgaaggtaaa gttaaaggta gagctccctt agaagcattt 480 atagttcctc taagagatag aattcgtagt atgaatgaaa ttgctgcaga agtaaattat 540 ttacctgaag cgcatgagga tttcttagtt tcagattcaa gcgagtataa tgacaaacta aataatatca actttgcttt gggtctaggg gtcagcgagt ttattgacta taaccggctc gaaaatatga tggaaaaaga acttcatcca ctgtatcttg aactttatgc tatgcggaga aatogocaaa ttoaagttgt aagagatgta tatocaaact tggaaogtgo gaaogoggtt 780 gttgaatcct taaagacaat taaagatata aaacaaagag ggaagaaact acaggaactt 840 cttgaaattt atatccaaag aagtggagat gttcgaaaac cagatgtact ccaacgattt attggaaaat atcaatcagt agttgatgaa gaaaaaaata aacttcaaga ttatttagaa tcagatattt ttgattcata tagtgtggat ggcgagaaaa taagaaataa agaaattaca 1020 ctcatcaata gagatgcata cttatctatg atttacagag ctcaatcgat ttcggaaatt 1080 aagacgattc gtgcagattt agaatcactt gtcaaatcat tccaaaatga agaaagtgac 1140 tctaaagtag agcctgaaag tcccgttaaa gtagaaaaac cagttgatga agaaaaacct 1200 1206 aaagat

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a primer for PCR cloning of 1026 bp polynucleotides encoding 40 kPPA.

<400> 3

ccatggcttt cgcttaccaa agtttcgaag cagtga

36

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a primer for PCR cloning of 1026 bp polynucleotides encoding 40 kPPA or 1206 bp polynucleotides encoding 46.5 kPPA.

<400> 4

ggatccttaa tctttaggtt tttcttcatc

30

<210> 5

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designated is a primer for PCR cloning of 1206 bp polynucleotides encoding 46.5 kPPA.

### <400> 5

# ccatggcttt cgctgattc gacagatatt tctg

34

## [0074]

【配列表フリーテキスト】配列番号3:40kPPAをコード する1026bpポリヌクレオチドのPCRクローニングプラ イマーを示す。

【OO75】配列番号4:40kPPAをコードする1026bpポリヌクレオチド、または46.5kPPAをコードする1206bpポリヌクレオチド、のPCRクローニングプライマーを示す。

【 O O 7 6 】配列番号 5 : 46.5kPPAをコードする1206b pポリヌクレオチドの P C R クローニングプライマーを示す。

### 【図面の簡単な説明】

【図1A】豚丹毒菌Fujisawa株の1881bpの感染防御 抗原遺伝子領域を含む2814bpの塩基配列。

【図1B】豚丹毒菌Fujisawa株の1881bpの感染防御抗原遺伝子領域を含む2814bpの塩基配列(図1Aのつづき)。

【図2】豚丹毒菌Fujisawa株の1881bp感染防御抗

原遺伝子のヌクレオチド配列。

【図3】豚丹毒菌46.5kPPAをコードする1206bp及び40kPPAをコードする1,026bpのポリヌクレオチドのPCRクローニング用プライマー。

【図4A】豚丹毒菌Fujisawa株の感染防御能をもつ46.5kP PAをコードする1206bpのポリヌクレオチドのヌク レオチド配列とアミノ酸配列。

【図4B】豚丹毒菌Fujisawa株の感染防御能をもつ46.5kP PAをコードする1206bpのポリヌクレオチドのヌク レオチド配列とアミノ酸配列(図4Aのつづき)。

【図4C】豚丹毒菌Fujisawa株の感染防御能をもつ46.5kP PAをコードする1206bpのポリヌクレオチドのヌク レオチド配列とアミノ酸配列(図4Bのつづき)。

20 【図5】豚丹毒菌の1026bpまたは1206bpの 発現用プラスミドの構造。

【図6】豚丹毒菌の1026bp及び1203bpで組換えたバチルス・ブレビスにより生産された40kPPA、46.5kPPAの精製工程と電気泳動像及びウエスタンブロッティング像。

## 【図1B】

GTTAGTATAT GAAACGAGTO	CTAAAAAATT	TAAAACCATT	CTTAGGTGCA	ATACTCATTT	2580
CAATTGCGTT CTTGTTTGTC	CAAGCTTTCG	CGGATTTGAA	GTTACCCAAC	TACATGTCTC	2640
ATATTGTTAA TGTTGGTATT	CAACAAAACG	GTGTTGAACA	TGCAAGTCCC	GATGAAATAA	2700
GCAAAGATGG TCATGACTTA	ATTGTAGCGA	TATTGCCACA	AGAACAAGGT	CAAGCATTCT	2760
CATCATCGTA TGAGATGAGO	GGAGATCGAT	ATGTTATTAA	ACAAAATATT	GATC	2814

#### 【図3】

## 【図4C】

(配列番号3)	AGA	GCT	CAA	TCG	ATT	TCG	GAA	ATT	AAG	ACG	ATT	CGT	GCA	GAT	TTA	GAA	1104
Ncol 5() cc atg get tic get tac cas agtitegaageagt	Arg	Ala	Gln	Ser	Ile	Ser	Glu	Ile	Lys	Thr	Ile	Arg	Ala	Asp	Leu	Ġlu	
M <u>A F A</u> Y Q			355					360					365			·	
(SP 切断点)	TCA	CTT	GTC	ΑΛΛ	TCA	TTC	CAA	ΛΛΤ	GAA	GΛΛ	AGT	GAC	TCT	AAA	GTA	GAG	1152
· (配列番号4)	Ser	Leu	Val	Lys	Seг	Phe	Gln	Asn	Glu	Glu	Ser	Asp	Ser	Lys	Val	Glu	
BanHl 7/1 ggaice ita ate tit agg tit tie tie ate		370					375					380					
stop ↑D K P K E E D	CCT	GAA	AGT	CCC	GTT	AAA	GTA	GAA	AAA	CCA	GTT	GAT	GAA	GAA	AAA	CCT	1200
1205bp	Pro	Glu	Ser	Pro	Val	Lys	Val	Glu	Lys	Pro	Val	Asp	G1 u	Glu	Lys	Pro	
(配列番号 5 ) Neo1 サイト	385					390					395					400	
cc atg gct tic gct gat tcg aca gatattictg	AAA	GAT	TAA						,								1209
M <u>A F A</u> D S	Lys	Asp	Stop	p													

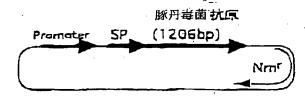
# 【図1A】

AATTATTTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTTC TTAGTTTCAG ATTCAAGCGA GTATAATGAC AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAA ATATGATGGA AAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATATC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAGT GGAGATGTTC CAAAACCAGA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAG AAATAAACA ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCATTTCG GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AGTGACTCTA AGAAAGAAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA CGGTGGATTA AGAAAGAAA ACAATGGTCC TATATTGGAA AATCAGTCGA AGGGGGGATTA AGAAAGAAA AAATGGAACAC GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTC TATATTGAAA ATCAGGGGGC GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TACCTCGATA ATACGGGTGC TATAGCTACG GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGGGGC GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGGGGC GGTGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGGGC AATGGCAACA  GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGGGC AATGGCAACA  GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGGC AATGGCAACA  GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGGC AATGGCAACA  GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGGC AATGGCAACA  GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACCAGGGC AATGGCAACA  CGGTGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACCAGGGC AATGGCAACA  CGGTGGAAAA CCAGTGGTAC TACCTTGAAA ACCAGGGCC AATGGCTACA  CGGTGGAAAA CCAGTGGAAC TAAAAGTAT TACCTTGAAA ACCAGGGAG TTTAAAATGA  CACTTTTTTA AGAATGTA TTATAGAATTA TATGAAATTA T	GATCTATTTA	TGAATCCAAT	CTAGGGAAAT	ACCTAGCCTC	TTATGGTTTA	GATAAAGGGG	60
AGAGTCAACT GAGATTGCAC CTTACCCAAA CTGAGCAAAA TTTAATGAAT CAAATTAAAA ATCTATAACT CTAAAACCAT CTTACTAAGG TGGTTTTCT TTTAAAAGTA ATGTATACAT TTCTTTCTTT ACTACTAAAA AGAGTATATT AAATAAATTA TTTACAAATT ATGTCAACAT ATATTATTCT TCAAGTGGAA ATCAAGAGGG GGATAAATTA TGAAAAAGAA AAAACACTA ATTTTCCGAAAG TAAGTCTTAT GTCGTGCTTA CTTTTAACAG CAATGCCACT ACAAACACCTA TTTTCCGAAAG TAAGTCTTAT GTCGTGCTTA CTTTTAACAG GGAACACGT TGAACACGCT TTTGCTGATT CGACAGAGTAT TTCTGTGATT CCACTAATCG GTGAACAAGT TGGATTGCTC CCAGTTTTAC CTGGGACAGG GGTACATGCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATTGCTC CCAGTTTTAC CTGGGACAGG GGTACATGCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATTGCTC CCAGTTTTAC CTGGGACAGG GGTACATGCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATTGCTC AAAGAGTACA AAAGTTTCGA AGCAGTGAAT AAAGTGAACC CGTTTCTTAT AAATGAGCCCA AAGCGGTACC AAAGTTTCGA AGCAGTGAAT CACCATATGT TTAAACAAAG CATCCAAAAC CTAGCAACTA GAATCGGCTA CAGAACTTT ATCCAGGATG CTATGTATCT TGAAAAATTTT CAAAAATAA CATTTTTAC CAGAACACTT AACACACT GAATTACTCCT GAATTACTCCT GAAACACAC GTATTTTACT AAAATATGAA GGTAAAGTTA AACGTAGACC TCCCTTAGAA CCATTTATAG TCCCTCTAAG AAATAGAAT CTCGATTGTA AACGTAGACC TCCCTTAGAA CCATTTATTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTTC TTAGTTTCAG ATTCAACCGA GTATAATGAC CAAACTAAAATA ATATCAACTT TCCTTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGCACTATAAC CCGCCTCGAAA ATATGATGGA AAAGAACTT CATCCACCTG ATCTTGAACT TTAGACTATACC CCGCTCGAAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACCTG ACCTGCAAAC CCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGGAA CAAACTATAAA CACCAATTATTA CAAACAATTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGGAA CAAACTACAG CCGGTTGTTG AAACTTATATA CAAACAAGAG GGAACTTTC CAAACCAGA TTAACCACAG TGTACTCCAA CCACTTTCTTG AAATTTATATA CAAACAACTA GTGACTTCCAA AACACACAG TGTACTCCAA CCACTTCTTG AAATTTATATA CAAACAATTAA GATATAAAAC AAAACACAGA TGTACTCCAA CCACTTCTTG AAATTTATATA CAAACACTTA TCTTAGATTA ACAGAGGGAA CAAACTCCAAACCAC TGAAACACAC TGCAATTCATA ATCCATTCCA AAAAACAAAAAC AAAACACAAAAAACA AAAACACAAAAAA	AAGCGTTTGT	CGAAGATATT	CAGTGGGTAC	TTAAGACGAT	GAATACTGCG	GTTTATAAAC	120
ATCTATAACT CTAAAACCAT CTTACTAAGG TGGTTTTCT TITAAAAGTA ATGTATACAT TTCTTTCTTT ACTACTAAAA AGAGTATATT AAATAAATTG TTTACAAATT ATGTCAACAT ATATTATTCT TCAAAGTGGAA ATCAACAGGG GGATAAATTA TGAAAAAGAA AAACACCTA TTTCCGAAAG TAAGTCTTAT GTCGTCCTTA CTTTTAACAG CAATGCCACT ACAAACAGGT TTTGCTGATT CGACAGATAT TTCTGTGATT CCACTAATCG GTGAACAAGT TGGATTGCTC CCAGTTTTAC CGACAGAATAT TCTGTGATT CCACTAATCG GTGAACAAGT TGGATTGCTC CCAGTTTTAC CGACAGAATAT TCTGTGATT CCACTAATCG GTGAACAAGT TGGATTGCTC CCAGTTTTAC CTGGGACAGG GGTACATCCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATGCTTAT ATTGAAAAAT TGGTATCTCT AATTAATCAA AAAGTGAACC AAAGGGGTACC AAAGTTCCA ACCAGTGAAT GAAGAGATTA ACCAGTTGT AAAAATGAAG CAATGAACTA GAATCAGCTA CACAAGAGTTT ATGCAGGATTG CTATGTATCT TAAACCAAAG CCAGCACTA GAATCAGCACA ACTGAGAAGTTT ATGCAGGATTG CTATGTATCT GAAAAATTC CACAACTA GAATCAGCAT ACAGAAGTTT ATGCAGGATTG ATTTACTCCT GAAATTCT CACAACACA GAATCAGAACATT CTCAAAACATT CGTAGGATTG ATTTACTCCT GAATTACCAG GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATAGAAT CGTAGAGTTA AACGTAGACC TCCCTTACGA GCATTTATAG TCCCTCTAAG AGATAGAATT CTAGAGTTA ACGTAGACC TCCCTTACAA AATTATTTAC CTGAACCGCA TGAGGATTC TTAGTTTCAG ATTCAACCAG TCCCAAAATCA CAAACTAAATA ATATCAACTT TCCTTTGGGT CTAGGCGTCA GCCAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAAA ATATGAAGGA AAAGAACTT CACCACTGT ATCTTGAACT TTATGCTATAAC CGGCTCGAAAA ATATGATGGA AAAGAACTT CACCACTGT ATCTTGAACT TATGTCTAGA CCGGTTGTTG AATTTATAT CCAAAGAAGT GAGCATTAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GAGCATTAATAC CAAACTTGGAA CACTCCCAA CGAGTTATTG GAAAATACA ATCAGTAGTAG GACATTAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GAGCACTTA TCCATGAAT ACAGAGCGAA GAAACTACAG GAACTTATTAG TCAAAAGAA AACTACAACA TCCATGTT ACAGAGCTC ATCGTCCAA CGATTTATTG GAAAATACA ATCAGTAGTT GAGGATGCC GAAAACCACA TCCATCCAA CGATTTATTG TAAAAAGAA ACAACTAAA AACACAACAAAAAAAAAA	GCGTGCAAAT	GCCACCCATT	GTTATGGTAT	CCAATTGCGC	ATTTGGTACC	GTTTATCGCG	180
TICTITCTIT ACTACTAAAA AGAGTATATT AAATAAATTG TITACAAATT ATGTCAACAT ATATTATTCT TEAAGTGGAA ATCAAGAGGG GGATAAATTA TGAAAAAGAA AAAACACCTA TITCCGAAAG TAAGTCTTAT GTGGTGCTTA CITITAACCAG CAATGCCACT ACAACACGCT TITGCTGATT CGACAGATAT TICTGTGATT CCACTAATCG GTGAACAAGT TGGATTGCTC CCACTITITAC CTGGGACAGG GGTACATGCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATGCTAT ATTGAAAAAT TGCTATCTCT AATTAATCAA AAAGTGAACC CGTTTCTTAT AAATCAGCCA AAGGGGTACC AAAGTTCCGA ACCAGTGAAT GAAGAGAGTTA ACCCGATTGT AAATGAGCCA AAGGGGTACC AAAGTTCCGA ACCAGTGAAT CACCATATCT TAAACAAAG CATCCAAAAC CTAGCAACTA GAATCGGCTA ACTGATGAA GCATACGTTG ATTTAACCAAAG CATCCAAAAC CTAGCAACTA GAATCGGCTA ACTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT GAAATTTT GAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT GAAATTTT GAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT GAAATTTT GAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT GAAATTTT GAAGAGATTA TTCCTCTAAG AGAGATTT CTAGTATGAT ATGCAGGATGACC TCCCTTAGAA GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGAGAATT CTAGTATCA ATGCAAGCGA GTATAATGAC GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGAGAATT CTAGGTATGA ATCAAGCGA GTATAATGAC GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGAGAATT CTAGGTATGA ATCAAGCGA GTATAATGAC AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGCACTATAAC CGGCTCGAAA ATATGATGGA AAAGAACTT CACCACTGT ATCTTGAAC TTATGCCTATG CGGGGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATATC CAAACTTGGAA CACTGCGAAC GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATTATAAAA AAACACGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTATAT CAAAGAAGT GAGGATGCC AAACCAGA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATACA ATCAGTAGT GATGAAGAAA AAAAACCAGA GAAACTACAG GAACTTAATGA GACAATTAAA GATATAAAAA AAACACACA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATACA ATCAGTAGT GTGATGCCG AGAAACCACA TGTACTCCAA AATTAACAC TCAATAGAGA TCCAAAGAGA TCCAAGAGCA TACACTGCA AACCACA TGTACTCCAA AATTAACAC CAATTCGTC AGATTTAACTAA TCAATGTGAT AACCAGGGAA GAAACTACAG GAATTAAAGA CAATTTAAA TAAGTGGTTC TAATTTGAAA AACCAGGGAA GAAACTACAG AACTCAAAGAGA ACCAAGAGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGCC AATGGAACA AACCTCAAAGAGA ACAAAGAAA CAAAGTGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGCC AATGGAACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGCC AATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC	AGAGTCAACT	GAGATTGCAC	CTTACGCAAA	CTGAGCAAAA	TTTAATGAAT	CAAATTAAAA	240
ATATTATTCT TCAAGTGGAA ATCAAGAGGG GGATAAATTA TGAAAAAGAA AAACACCTA TTTCCGAAAG TAAGTCTTAT GTCGTGCTTA CTTTTAACAG CAATGCCACT ACAAACAGCT TTTGCTGATT CGACAGATAT TTCTGTGATT CCACTAAATCG GTGAACAAGT TGATTGCTC CCAGTTTTAC CTGGGACAGG GGTACATGCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATTGCTC CCAGTTTTAC CTGGGACAGG GGTACATGCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATGCTTAT ATTGAAAAAT TGGTATCTCT AATTAATCAA AAAGTGAAGC CGTTTCTTAT AAATGAGCCA AAAGTGACAC AAAGTTTCCA ACCAGTGAAT GAAGAGATTA ACTCGATTCT AAGTGAACCT AAAAATGAAG GAATGAGCT TCAAAACATT CACCATAGT TTAAACAAAG CATCCAAAAC CTAGCAACTA GAATCGGCTA CAGAAGTTT ATGCAGGATG CTATGTATCT TGAAAAATTTT CAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT GAATTACCAG GTGAAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GGATACGTTG ATTTACTCCT GAATTACCAG GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATACATT CGTAGTATGA ATGAAATTGC TGCAGAAGTA AATTATTTAC CTGAAGGCCA TGAGGATTTC TTAGTTTCAG ATTCAAGCCG GTATAAATGAC CGCTTCGAAA ATATGATGGA AAAAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAACG GTATAAATGAC CGCCTCGAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACCTG ATCCAACACG GTATAAATGAC CGCCTCGAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACCTG ATCCACACG GTATAAATGAC CGCGTGGTG ATCCCTTAAA GACAATTAAA GATTATAAAC CAAACTGGAA ACCACGGGAA CGCGTTGTTG AATCCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC CAAACTGGAA GAACTCACG CGCTTCGTA AAATTTATAT CCAAAGAAGT GAGAAGTTA CAACACTGGA GAAACTCACG CGAATTCTT GAAAATACA ATCCATAAA GACAATTAAA CAACAGGGGAA GAAACTCACG CGAATTTATTG GAAAATACA ATCCATAAAG GATATAAAAC CAACACGGGAA GAAACTCACG CGAATTTATTG GAAAATACA ATCCATAAAGA GATATAAAACA AAACAACGACA TCAACTCCAA ATTACACCCA TCAATAGAGA TCCATAAGAA TCAACTTAGAA TCAACTTCCAA AAATAAAACT TCAAGAATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTGA TTCATTAGAA TCACTTGAAA AAAATAAACT TCAAGAATTAT TTAGAATCAG CAATTTTTGA TTCATTAGAA TCACTTGAAA AAAATAAACT TCAAGAATTAT TTAGAATCAG CAATTTTTGA TCAATAGAA TCACTTGAAA AAAATAAACT TCAAGAATTAT TTAGAATCAG CAATTTATGA TACCTTGAAA AAACAAGAGGA AAAACAACACA TACATTAGAA AAACAAGAA AAAATAAACA AAACAAGAA GAAATGAAAAAAAAAA	ATCTATAACT	CTAAAACCAT	CTTACTAAGG	TGGTTTTTCT	TTTAAAAGTA	ATGTATACAT	300
TTTCCGAAAG TAAGTCTTAT GTCGTGCTTA CTTTTAACAG CAATGCCACT ACAAACAGCT TTTGCTGATT CGACAGATAT TTCTGTGATT CCACTAATCG GTGAACAAGT TGGATTGCTC CCAGTTTTAC CTGGGACCAG GGTACATCGT CAGCAATACA ACAAAATGAC TGGATTGCTC ATTGAAAAAT TGGTATCTCT AATTAATCAA AAAGTGAACC CGTTTCTTAT AAATGAGCCA AAAGGGGACC AAACTTTCGA ACCAGTGAAT GAAGAGATTA ACTCGATTGT AAATGAGCCA AAAAGTACAG GAATCAGCT TCAAAACATT CACCATATGT TTAAACAAAG CATCCAAAC CTAGCAACTA GAATCGGCTA CAGAAGTTT ATGCAGGATG CTATGTATCT TGAAAAATTT GAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCGT GAATTACCGG GTGAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GGTAAAGTT AAAGGAGACAC TCCCTTAGAA GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATCAACTAG CTCCCTTAGAA ACTTAATTAC CTGCAGCGCA TGAGGATTTC TTAGGTATGA ATCAACAGC TCCCTTAGAA ACTTAATTAC CTGCAGCGCA TGAGGATTTC TTAGGTATGA ATCAACAGC GTATAATGAC CACCTCGAAA ATTGATCACT TCCTTTGGGT CTAGGGGGTCA GCGAGTTAT TAGCTATAC CGGCTCGAAA ATTGATGAG AAAGAACTT CATCCACTCT ATCTTGAACT TTAGCTATAC CGGCTCGAAA ATTGATGAG AAAGAACTT CATCCACTCT ATCTTGAACT TTAGCTATAC CGGCTCGAAA AATTGATGAG AAAGAACTT CATCCACTCT ATCTTGAACT TTAGCTATAC CGGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTATTAG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAAACAA AAAATAAACT TCAACATTATAC CGGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATACAG AAATTTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTCC GAAAACCACA TCTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAAA TCAAGAGTAT TTAGAATCAG ATATTTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAAA AATCAAGAA AATCAACAGA TCAAAAAGAA GCAACTTAAAAAC TCAATCAGAACA AAACCACAA TCAAATACAA ACCACAATGAGAA AAATAAAACA TCAAGAGAA AAATAAAACA TCAAGAGAA AAATAAAACA ACCACAATGAAA AACCACAA AATCAAGAA AACCACAA AACCACAA AACCACAA CAAATGATA TAACATTAAAAACA AACCACAA AACCACAA AACCACAA CAAATGATA CAACTGGTAC TACCTTGAAA ACCACAGGGGA AATGGAAAA AAATGAAAAA AACCACAA AATGAAAAAAAAAA	TTCTTTCTTT	ACTACTAAAA	AGAGTATATT	AAATAAATTG	TITACAAATT	ATGTCAACAT	360
TTTGCTGATT CGACAGATAT TTCTGTGATT CCACTAATCG GTGAACAAGT TGGATTGCTC CCAGTITTAC CTGGGACAGG GGTACATGCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATGCTTAT ATTGAAAAAT TGGTATCTCT AATTAATCAA AAAGTGAACG CGTTTCTTAT AAATGAGCCA AAGGGGTACC AAAGTTCGA ACCAGTGAAT GAAGAGTTA ACTCGATTGT AAGTGAACT AAAAATGAAG GAATGGGCTA CAGAAGTTTT ACCACATATGT TTAAACAAAG CATCCAAACC CTAGCAACTA GAATGCGCTA CAGAAGTTTT ATGCAGGATG CTATGTATCT TGAAAAATTT CAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCGT GAATTACCAG GTGAAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GCATACGTTG ATTTACTCGT GAATTACCAG GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATGGATTC CTAGGAGTG ATTTACACGG GTGAAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GGTAAAGTTG ATTTACACGG GTAGAACTTC CAAACTAAATA ATATCAACTT TCCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGCCTCGAAA ATATGAAGGA AAAGAACTT CATCCACTGT ATCTGACT TTATGCTATG CGGAGAAATA ATATCAACTT TCCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGCGCTCGAAA ATATGAAGGA AAAGAACTT CATCCACTGT ATCTGGACT TTATGCTATG CGGAGAAATC CCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATAAC CACACTTGGACT TTATGCTATG CGGAGGAAATC CCCAAATTCA AGTGTAAGA GATGTATAAC CACACTTGGAC TTATGCTAGG CAACTTCTTG AATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC CAAACTCGGA CAACTTCTG AATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC CAAAACCAGA TCTACCCCAA CGATTTATTG GAAAATACA ATCAGTATA GACAATTAAA GAACAACAAA AAAGAGGGAA GAAACTACAG CAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC CAAAACCAGA TCTACCCCAA CGATTATTG GAAAATACA ATCAGTATT TCTATGATT ACACAGCCA TCTACCCCAA CGATTACCA TCAATACAGA TCCATTAAAAAC AAACACAGA TCAACTTCGA CGAATTAACA CACATTATAAA CACATTCTA ACCAGCTCA ATCGATTTC CAAAATCACA AAAACACAA TACAGTACTA TCTATACATT CCAAACACCAA TCGATTTCC CAAATTACAC CAATTCCTC AGATTCTTA TCTATGATT ACACAGCCC ATCGATTAT TTAGAATCAAA AAAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	ATATTATTCT	TCAAGTGGAA	ATCAAGAGGG	GGATAAATTA	TGAAAAAGAA	AAAACACCTA	420
CCAGTITITAC CTGGGACAGG GGTACATGCT CAGGAATACA ACAAAATGAC TGATGCTTAT ATTGAAAAAT TGGTATCTCT AATTAATCAA AAAGTGAAGC CGTTTCTTAT AAATGAGCCA AAGGGGTACC AAAGTTICGA AGCAGTGAAT GAAGAGTTA ACTCGATTGT AAGTGAACTT AAAAAATGAAG GAATGAGCT TCAAAACATT CACCATATGT TTAAACAAAG CATCCAAAAC CTGCACACTA GAATCGGCTA CAGAAGTTTT ATGCAGGATG CTATGTATCT TGAAAAATTTT CAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACCGT GAATTACCAG GTGAAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GGTAAAGTTA AAGGTAGAGC ICCCTTAGAA GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATGAAATTGC TGCAGAGGA TCAGGAATTC CTAGGATTAA ATTACACG TTCCTTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATGAAATTGC TGCAGAGGAA AATTATTAC CTGAAGGGCA TGAGGAATTC CTAGGGTCA GCGAGTTAT TGCACTAAACAAAA ATATCAACTT TCCTTTGGGT CTAGGGGCCA GCGAGTTTAT TGCACTAAACAAAAAAAAAA	TTTCCGAAAG	TAAGTCTTAT	GTCGTGCTTA	CTTTTAACAG	CAATGCCACT	ACAAACAGCT	480
ATTGAAAAAT TGGTATCICT AATTAATCAA AAAGTGAAGC CGTTTCTTAT AAATGAGCCA AACGGGTACC AAAGTTTCCA AGCAGTGAAT GAAGAGATTA ACTCGATTGT AAAAATGAAG GAATGAGTCT TCAAAACATT CACCATATGT TTAAACAAAG CATCCAAAAC CTACCAACTA GAATCGGCTA CAGAAGTTTT ATGCAGGATG CTATGTATCT TGAAAATTTT CAAAGATTAA CGATCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT TGAAAATTTT CAAAGATTAA CGATTCCTGA ACATTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT TGAAAATTTT CAAAGATTAA CGATTCCTGA ACATATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT TGAAAATTTT CACATTATAG TCCCTCAAG ACATAGAATT CGTAGTATGA AAGGTAGAGC TCCCTTAGAA CCATTTATAG TCCCTCAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA AAGGTAGAGC TCCCTTAGAA CCATTTATAG TCCCTCAAG AGATAGAATT CTAGGTTCAA AAGGTAGAGC TCCCTTAGAA AAACTAAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGACTTTAT TGACATATACC CGCCTCGAAA ATATGATGAA AAAGAACTT CATCCACTCT ATCTTGACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATTAAAAC AAAGAGGGGAA GAAACTACAG CACGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGGAA GAAACTACAG CAACTTCTTC AAATTTATAT CCAAAGAAGT GCAGATCTTC CAAAACCACA TGTACTCCAA CAACTTATTTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGAGTAA TTAGGAATCAA ATCATTATAT TCAATATAGT GTGGATGGCG AGAAATAAAA TCAATTTTTGA TTCAATATAGT GTGGATGGCG AGAAATAAAA AAATAAAACT TCAAGAGAA TACAATTAGA TGCATTAGAA TCAATTAGAA TCAATTAGAA TCAATTAGAA CAAACCACA TCTACTCCAA AATTAAAAAAACAAAAAAAA	TITGCTGATT	CGACAGATAT	TTCTGTGATT	CCACTAATCG	GTGAACAAGT	TGGATTGCTC	540
AACGGGTACC AAAGTTTCGA AGCAGTGAAT GAAGAGATTA ACTCGATTGT AAGTGAACTT AAAAATGAAG GAATGAGTCT TCAAAACATT CACCATATGT TTAAACAAAG CATCCAAAAC CTAGCAACTA GAATCGGCTA CAGAAGTTT ATGCAGGATG CTATGTATCT TGAAAATTTT GAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCGT GAATTACGAG GTGAAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GGTAAAGTTA AAGGTAGAGC TCCCTTAGAA GCATTATATG TTCCTCTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATGAAATTCC TGCAGAAGTA AATTATTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTTC TTAGTTTCAG ATTCAAGCGA GTATAATGAC AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAAA ATATGAAGGA AAAAGAACTT CATCCACCTG ATCTTGAACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATATC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC CGGGTGTGT AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTATAT CCAAAAGAAGT GGAGATTTC CAAAACTAGAC GTACCACCAC CGATTTATTG GAAAATATCA ATCATTTTGA TCCAAAACAAAA	CCAGTTTTAC	CTGGGACAGG	GGTACATGCT	CAGGAATACA	ACAAAATGAC	TGATGCTTAT	600
AAAAATGAAG GAATGAGTCT TCAAAACATT CACCATATGT TTAAACAAAG CATCCAAAAC CTAGCAACTA GAATCGGCTA CAGAAGTTTT ATGCAGGATG CTATGTATCT TGAAAATTTT GAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT GAATTACGAG GTGAAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GGATAGGTTA AAGGTAGAGC TCCCTTAGAA GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATGAAATTGC TGCAGAAGTA AATTATTTTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTTC TTAGTTTCAG ATTCAAGCCA GTATAATGAC AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAA ATATGATGAA AAAGAACTT CATCCACCTT ACTCTGAACT TTATGCTATG CGGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATATC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC GCGGTTGTG AATCCTTAAA GACATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC CAAAACTAGGA AAAATAAACA AAAGAACTGA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC CAAAACCAGA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGAGTAT TTAGCATAC CGATTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGAGTAT TTAGCATACA CGATTTATG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGAGTA GAAACTACAG CGATTCTTG AAATTATAT TCCAAAGAGT GGAGATGTTC CAAAACCAGA TGTACTCCAA ATTACCACCA TCAATAGAGA TGCATACTA TCATTAGATT ACAGAGCCCA ATCGATTTCC GAAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AAACAACAGA TGGATTCC GAAACTTAAAG ACGATCCTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGAACCTAAA AGAAGAAA CAAATGGTAC TACCTCGATA ATCAGGTCG ATCGAACA AAACCTAAAG ACGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTCGAAA ATCAGGTCG AATGGCAACA CGGTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGTGC AATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAAT	ATTGAAAAAT	TGGTATCTCT	AATTAATCAA	AAAGTGAAGC	CGTTTCTTAT	AAATGAGCCA	660
CTAGCAACTA GAATCGGCTA CAGAAGTTTT ATGCAGGATG CTATGTATCT TGAAAATTTT GAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT GAATTACGAG GTGAAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GGTAAAGTTA AAGGTAGAGC TCCCTTAGAA GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATGAAATTGC TGCAGAAGTA AATTATTTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTC TTAGTTTCAG ATTCAAGCGA GTATAATGAC AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC CAAAACCAGA TGTACCCAA CGATTGATG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC GAAAACCAGA TGTACCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCCGTAGT GATGAAGAAA AAAAAAAACAAA AAAAAAAAAC CGATTCATG AAATTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG ACAAAACCAGA TGTACTCCAA ATTACACCCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCACTATTCA AAATAAAAAAAAAA	AAGGGGTACC	AAAGTTTCGA	AGCAGTGAAT	GAAGAGATTA	ACTCGATTGT	AAGTGAACTT	720
GAAAGATTAA CGATTCCTGA ACTTGATGAA GCATACGTTG ATTTACTCCT GAATTACGAG GTGAAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GGTAAAGTTA AAGGTAGAGC TCCCTTAGAA GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATGAAATTGC TGCAGAAGTA AATTATTTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTC TTAGTTTCAG ATTCAAGCGA GTATAATGAC AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATATC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACCAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC GAAAACCAGA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGT GATGAAGAAA AAAAAAAACA TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAAA ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACATTA TCAAGATTAT ACAGAGCTCA ATCGATTTGG GAAAATAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCCATTGTCA AATCAGTCGA ATCGATTCG GAAAATAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCCATTGTCA AATCATTCCA AAAAGAAGAA AATCAATCAA AAACCACA AGAAGGAC TGAAAAGAAA TAAGAAGAAA AAACACACA AGAAGAGAC CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCCACTTGTCA AATCAGAGAA TTCAAAAGAA TAAACCTTA AGAGAAGAC CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCCACTTGTCA AATCATTCCA AAAAGAAAAACCAGT TGATGAAAGAA ACCCTAAAAGAA GCTAGTGTGC CAAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA TAAGGGAGA CAAATGGTAC TAAATTGAAA ATCAGGGTGG AATGAAAGAA ACCTAAAAGAA ACCTAAAAGAA CAAATGGTAC TAACTTGAAA AATCAGGGCG CAATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGCG CATGGCAACA GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGCG CAATGGCAACA GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGGCG AATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGTGC AATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGTGC AATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGGC AATGGCAACA CGATGGAAAA AG	AAAAATGAAG	GAATGAGTCT	TCAAAACATT	CACCATATGT	TTAAACAAAG	CATCCAAAAC	780
GTGAAACACC GTATTTTAGT AAAATATGAA GGTAAAGTTA AAGCTAGAGC TCCCTTAGAA GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATGAAATTGC TGCAGAAGTA AATTATTTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTTC TTAGTTTCAG ATTCAAGCGA GTATAATGAC AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGATATAC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTC CAAAACCAGA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAACAACA TCAAGAGAA ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCTATGATT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAAATAAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AAATCATTCA AAATTAAAAAAAACA AAAAACCAGT TGAAGAAGAA AAAATAAACT TCAAGAATTAA AAGAAGAAA GCTAGATGTA TCAATAGAAA AAAAACCAGT TGAAGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGAC TGCATACTTA TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCA AAATGAAGAA AGGTGACTCTA AAGAAGAAA GCTAGGTGC TAAAAGGAA TCAATCAGAAAAAACAC AAAACCAGAA AAAAACCAGT TGATGAAGAAA AGGTGGATTA AGAAAGAAA AAAATGGTAC TAACTTGAAA AACCAGAGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TAACTTGAAA AATCAGGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AAGGAAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA	CTAGCAACTA	GAATCGGCTA	CAGAAGTTTT	ATGCAGGATG	CTATGTATCT	TGAAAATTTT	840
GCATTTATAG TTCCTCTAAG AGATAGAATT CGTAGTATGA ATGAAATTGC TGCAGAAGTA AATTATTTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTTC TTAGTTTCAG ATTCAAGCGA GTATAATGAC AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGATATAC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTC CAAAACCAGA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTGA TCCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAACAACA AAATAAACT TCAAGATTAT TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AAATCATTCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGAC CTGAAAGCAC CGTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAGAAA AGGTGACTCTA AAGTAGAGAC CTGAAAGCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AGGTGACTCTA AAGTAGAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTGGATTA AGAAAGATAA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGTGC AATGGCAACA GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGAG TTTAAAATGA CCATTTTTA AGTAA	GAAAGATTAA	CGATTCCTGA	$\mathbf{ACTTGATGAA}$	GCATACGTTG	ATTTACTCGT	GAATTACGAG	900
AATTATTTAC CTGAAGCGCA TGAGGATTTC TTAGTTTCAG ATTCAAGCGA GTATAATGAC AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAA ATATGATGGA AAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATATC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAGT GGAGATGTTC CAAAACCAGA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAG AAATAAACA ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCATTTCG GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGAC CTAAGTGGTC CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAATAGAA AGGGGGGATTA AGAAAGAAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTGGATTA AGAAAGAAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TATCTTGAAA AATCAGGTGC AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TATCTTGAAA AATCAGGTGC CATGGCAACA GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TATCTTGAAA AATCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGTGC CATGGCCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGTGC CATGGCTACA CGGTGGAAAA CCGGTGCAAC CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACCCAGGTGC CATGGCTACA CGGTGGAAAA AGGTACCAAC CAATTGAAT TACCTTGAAA ATCAGGTAC TACATTTATA AAATAT	GTGAAACACC	GTATTTTAGT	AAAATATGAA	GGŤAAAGTTA	AAGGTAGAGC	TCCCTTAGAA	960
AAACTAAATA ATATCAACTT TGCTTTGGGT CTAGGGGTCA GCGAGTTTAT TGACTATAAC CGGCTCGAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATAAC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTATAT CCAAAGAACT GGAGATGTTC CAAAACCACA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAATAAG AAATAAACT ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCAATTGCA AAACCACA TGTACTCCA AGTGACTCTA AAGTAGAGC TGAAAGTCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGC TGAAAGTCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AGTGACTCTA AAGAAGAAA GCTAGTTGAT TAAATTGAGA AATCAGTGGA AGGGGGATTA AGAAAGAAA GCTAGTTGAT TAAATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGGTGGAATTA AGAAAGAAA CAAATGGTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TACCTCGATA ATCCGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AAGTACAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTACAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTACAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC CATGGCTACA CGGTGGAAAA CGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC CATGGCTACA CGGTGGAAAA CGGTACCAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC CATGGCTACA CGGTGGAAAA CGGTACCAA CAAATGGTAC TACCT	GCATTTATAG	TTCCTCTAAG	AGATAGAATT	CGTAGTATGA	ATGAAATTGC	TGCAGAAGTA	1020
CGCCTCGAAA ATATGATGGA AAAAGAACTT CATCCACTGT ATCTTGAACT TTATGCTATG CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTATATC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GAGAATGTTC GAAAACCACA TGTACTCCAA GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GAGAATGTTC GAAAACCACA TGTACTCCAA ITAGAATCAG ATATTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTGA TGCATACTTA TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AGACCTAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTGGATTA AGAAAGATAA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGG CAAGGCAACA GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC CATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGAG TTTAAAATAGA CCGTTCATATT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGAT ATATATTTAT CACTTTTATA AGTAAATGTA TTTATGAATTA TCATTTGAT ATATATTTAT CACTTTTATTA AGTAAATGTA TTTATAAATTA TCATTTGATA ATATATTTAT CACTTTTATTA AGAATTAA TATATATTAT CACTTTTATTA ATATATTAT CACTTTTATTA ATATATTAT TATGAATTA TATATATTAT CACTTTTATTATATATAT TTTTGAAACA TCTTTAAACA TCTTTTAATGC	AATTATTTAC	CTGAAGCGCA	TGAGGATTTC	TTAGTTTCAG	ATTCAAGCGA	GTATAATGAC	1080
CGGAGAAATC GCCAAATTCA AGTTGTAAGA GATGTTATC CAAACTTGGA ACGTGCGAAC GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC GAAAACCACA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAATAAGA AAATAAACT TCAATAGAGA TGCATACTTA TCATATAGT GTGGATGCG AGAAATAAG AAATAAAGAA ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCATGATTT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AGACCTAAAG ACCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTGGATTA AGAAAGATAA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCAC TTACATTACA							1140
GCGGTTGTTG AATCCTTAAA GACAATTAAA GATATAAAAC AAAGAGGGAA GAAACTACAG GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC GAAAACCAGA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAAC ATCAGATTAC GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTA AACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AGGTGGATTA AGAAAGAAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA CGGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGCG AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAT GATGGTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAT GATGGTACA CGATGGAAAA AGGTACCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAT GATGGTACA CGATGGAAAA TGAAAAGTAT TACCTTGAAA ACTCAGGAAG TTTAAAATAG CGATGGAAAA TGAAAAGTAT TATAGAAATTA TATATTTAT CACATTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATAACTA ATAAATGAAC CTTTTAATGC	CGCCTCGAAA	ATATGATGGA	AAAAGAACTT	CATCCACTGT	ATCTTGAACT	TTATGCTATG	1200
GAACTTCTTG AAATTTATAT CCAAAGAAGT GGAGATGTTC GAAAACCAGA TGTACTCCAA CGATTTATTG GAAAATACA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAG AAATAAAGAA ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AGAACCTAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTGGATTA AGAAAGATAA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA CCAATTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAG TTTAAAATAG CGATGGAAAA CCAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAG TTTAAAATAG CGATGGAAAA CCAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCAC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCAC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCAC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAG TTTAAAATAG CGATGGAAAA AGGAATACTA TAAAATGAA TACATTATATTAT	CGGAGAAATC	GCCAAATTCA	AGTTGTAAGA	GATGTATATC	CAAACTTGGA	ACGTGCGAAC	1260
CGATTTATTG GAAAATATCA ATCAGTAGTT GATGAAGAAA AAAATAAACT TCAAGATTAT TTAGAATCAG ATATTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAG AAATAAAGAA ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAAATAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAAACCAGT TGATGAAGAA AAACCTAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTGGATTA AGAAAGATAA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA CTATTGATGG TAAAAAGTAT TACCTTGAAA ACTCAGGAAG TTTAAAATAG CGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTAT ACATTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC CTTCTTCATT ATATCGATAA TCTACAATTA TATGTAAATAT TTTTGAAACA TCTTTAAATGC	GCGGTTGTTG	AATCCTTAAA	GACAATTAAA	GATATAAAAC	AAAGAGGGAA	GAAACTACAG	1320
TTAGAATCAG ATATTTTGA TTCATATAGT GTGGATGGCG AGAAAATAAG AAATAAAGAA ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAAGCCC GTTAAAGTAG AAAAAACCAGT TGATGAAGAA AAACCTAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTGGATTA AGAAAGATAA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA CCAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCAA GATGGTTACA CAATTTTTA AGTAAATGTA TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTAT ACATTTTTA AGTAAATGTA TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTAT CCTTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAAATGC CTTTTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTTGAAACA TCTTTTAATGC	GAACTTCTTG	TATATTAAA	CCAAAGAAGT	GGAGATGTTC	CAAAACCAGA	TGTACTCCAA	1380
ATTACACTCA TCAATAGAGA TGCATACTTA TCTATGATTT ACAGAGCTCA ATCGATTTCG GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AAACCTAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTGGATTA AGAAAGATAA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGCGC AATGGCTACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ATCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGCC AATGGCTACA CGATGGAAAA CCAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAT GATGGTTACA CGGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT TACCTTGATA AATCAGGAAT TATATATTAT ACATTTTTA AGTAAATGTA TTGCAACATTA TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCAACATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC CTTCTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC	CGATTTATTG	GAAAATATCA	ATCAGTAGTT	GATGAAGAAA	AAAATAAACT	TCAAGATTAT	1440
GAAATTAAGA CGATTCGTGC AGATTTAGAA TCACTTGTCA AATCATTCCA AAATGAAGAA AGTGGCTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA AAAACCTAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA AACCTAAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA AGGTGGAACA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GCTTGGAAGA AGGTAGCAACA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGGTGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGGCG AATGGCTACA CGGTGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAT GATGGTTACA CGGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT TACCTTGATA AATCAGGAAT TTTAAAAATAG ACGGTTACA CCGTCTATTT TTTATGAATTT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCAACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC CTTTTAATGC TATTTCAATTA TTTTGAAACA TCTTTAATGC	TTAGAATCAG	ATATTTTTGA	TTCATATAGT	GTGGATGGCG	AGAAAATAAG	AAATAAAGAA	1500
AGTGACTCTA AAGTAGAGCC TGAAAGTCCC GTTAAAGTAG AAAAACCAGT TGATGAAGAA IAAAACCTAAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA IAAACCTAAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA IAACTGGAAGA AGGTAGCAACA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC TATAGTTACG IAACATGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA IAACTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA IAACTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA IAACTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA IAACTGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA IAACTGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA IAACTGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA IAACTGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA IAACAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAT GATGGTTACA IAAAAAGTAT CAATTGAAAT CTATTGATG TAAAAAAGTAT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT IAACAATTAT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT IAACAATTAA TTATGAAATA TTTTGAAACA TCTTTAAAGC IAAAAAGACA TCTTTAAATGC IAAAAAAGACA TCTTTAAATGC IAAAAAAGACA TCTTTAAAGAC ICCTTTAAATGC IAAAAAAGACA TCTTTAAATGC IAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	ATTACACTCA	TCAATAGAGA	TGCATACTTA	TCTATGATTT	ACAGAGCTCA	ATCGATTTCG	1560
AAACCTAAAG ATCAAAAGAA GCTAGTTGAT CAATCAAAAC CCGAATCGAA TTCAAAAGAA GGGTGGATTA AGAAAGAAA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAAC CAAATGGTAC TACCTCGATA ATCAGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGAAT GATGGTTACA CGGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT GCATTTAAAGA ACGATGGAAG TTTAAAAATAG ACGGGATATC CCGTCTATTT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT ACATTTTAT AGTAAATGAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC C	GAAATTAAGA	CGATTCGTGC	AGATTTAGAA	TCACTTGTCA	AATCATTCCA	AAATGAAGAA	1620
GGGTGGATTA AGAAAGATAA TAAGTGGTTC TATATTGAGA AATCAGGTGG AATGGCAACA GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TACCTCGATA ATACGGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TATCTTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA CTATTGATGG TAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGGAAG TTTAAAAATAG CGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC GTTCTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC	AGTGACTCTA	AAGTAGAGCC	TGAAAGTCCC	GTTAAAGTAG	AAAAACCAGT	TGATGAAGAA	1680
GGTTGGAAGA AGGTAGCAGA CAAATGGTAC TACCTCGATA ATACGGGTGC TATAGTTACG GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TATCTTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA GGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGGAAG TITAAAATAG ACGGGATATC CCGTCTATTT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC GTTCTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC	AAACCTAAAG	ATCAAAAGAA	GCTAGTTGAT	CAATCAAAAC	CCGAATCGAA	TTCAAAAGAA	1740
GGTTGGAAGA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TATCTTGAAA AATCAGGTGC GATGGCAACA 1 GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA 1 GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA 2 GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA 2 GGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA 2 GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA 2 GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGATA AATCAGGAAT GATCGTTACA 2 GGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGGAAG TTTAAAATAG 2 ACGGGATATC CCGTCTATTT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT 2 ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC 2 GTTCTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC 2	GGGTGGATTA	AGAAAGATAA	TAAGTGGTTC	TATATTGAGA	AATCAGGTGG	AATGGCAACA	1800
GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCAACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGATA AATCAGGAAT GATGGTTACA CGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGGAAG TTTAAAAATAG ACGGGATATC CCGTCTATTT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC CTTCTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC	GCTTCGAAGA	AGGTAGCAGA	CAAATGGTAC	TACCTCGATA	ATACGGGTGC	TATAGTTACG	1860
GGATGGAAGA AAGTATCAAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ATTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA CGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGATA AATCAGGAAT GATGGTTACA CGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGGAAG TITAAAAATAG ACGGGATATC CCGTCTATTT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC CTTCTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC	GGTTGGAAGA	AGGTAGCAAA	CAAATGGTAC	TATCTTGAAA	AATCAGGTGC	GATGCCAACA	1920
GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGTGC GATGGCAACA GGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGATA AATCAGGAAT GATCGTTACA GGTTCAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGGAAG TTTAAAATAG ACGGGATATC CCGTCTATTT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC GTTGTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC	GGATGGAAGA	AAGTATCAAA	CAAGTGGTAC	TACCTTGAAA	ACTCAGGTGC	AATGGCAACA	1980
GGATGGAAGA AAGTATCGAA CAAGTGGTAC TACCTTGAAA ACTCAGGCGC AATGGCTACA CGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGATA AATCAGGAAT GATGGTTACA CGTTCAAAAAT CTATTGATGG TAAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGGAAG TTTAAAAATAG ACGGGATATC CCGTCTATTT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC CTTCTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC	GGATGGAAGA	AAGTATCAAA	CAAGTGGTAC	TACCTTGAAA	ATTCAGGCGC	AATGGCTACA	2040
GGATGGAAAA AGGTAGCAAA CAAATGGTAC TACCTTGATA AATCAGGAAT GATGGTTACA GGTTCAAAAT CTATTGATGG TAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGGAAG TITAAAATAG ACGGGATATC CCGTCTATTT TITTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC GTTCTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC 2	GGATGGAAAA	AGGTAGCAAA	CAAATGGTAC	TACCTTGAAA	ACTCAGGTGC	GATGGCAACA	2100
GGTTCAAAAT CTATTGATGG TAAAAAGTAT GCATTTAAGA ACGATGGAAG TITAAAATAG 2 ACGGGATATC CCGTCTATTT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTTAT 2 ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC 2 GTTCTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC 2	GGATGGAAGA	AAGTATCGAA	CAAGTGGTAC	TACCTTGAAA	ACTCAGGCGC	AATGGCTACA	2160
ACGGGATATC CCGTCTATTT TTTATGAATT TATGAAATTA TCATTTGTAT ATATATTAT ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC GTTGTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC 2	GGATGGAAAA	AGGTAGCAAA	CAAATGGTAC	TACCTTGATA	AATCAGGAAT	GATGGTTACA	2220
ACATTTTTTA AGTAAATGTA TTGCACATTA AAATAAATAG GAATATACTA ATAAATGAAC 2 GTTGTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC 2	GGTTCAAAAT	CTATTGATGG	TAAAAAGTAT	GCATTTAAGA	ACGATGGAAG	TTTAAAATAG	2280
GTTGTTCATT ATATCGATAA TGTACAATTA TATGTAATAT TTTTGAAACA TCTTTAATGC 2	ACGGGATATC	CCGTCTATTT	TTTATGAATT	TATGAAATTA	TCATTTGTAT	<b>TATTTTAT</b>	2340
	ACATTTTTA	AGTAAATGTA	TTGCACATTA	AAATAAATAG	GAATATACTA	ATAAATGAAC	2400
GAGGGTTAAA AAAAATAACC TAAACTTTGA TGTGCTAAGA TATGCATAGA TAAGAAAGAG 2	GTTGTTCATT	ATATCGATAA	TGTACAATTA	TATGTAATAT	TTTTGAAACA	TCTTTAATGC	2460
·	GAGGGTTAAA	AAAAATAACC	TAAACTTTGA	TGTGCTAAGA	TATGCATAGA	TAAGAAAGAG	2520

# [図2]

	ATGAAAAAGA	AAAAACACCT	ATTTCCGAAA	GTAAGTCTTA	TGTCGTGCTT	ACTTTTAACA	60
	GCAATGCCAC	TACAAACAGC	TTTTGCTGAT	TCGACAGATA	TTTCTGTGAT	TCCACTAATC	120
	GGTGAACAAG	TTGGATTGCT	CCCAGTTTTA	CCTGGGACAG	GGGTACATGC	TCAGGAATAC	180
	AACAAAATGA	CTGATGCTTA	TATTGAAAAA	TTGGTATCTC	TAATTAATCA	AAAAGTGAAG	240
	CCGTTTCTTA	TAAATGAGCC	AAAGGGGTAC	CAAAGTTTCG	AAGCAGTGAA	TGAAGAGATT	300
	AACTCGATTG	TAAGTGAACT	TAAAAATGAA	${\tt GGAATGAGTC}$	TTCAAAACAT	TCACCATATG	360
	TTTAAACAAA	GCATCCAAAA	CCTAGCAACT	AGAATCGGCT	$\Lambda C\Lambda G\Lambda \Lambda GTTT$	TATGCAGGAT	420
	GCTATGTATC	TTGAAAATTT	TGAAAGATTA	ACGATTCCTG	AACTTGATGA	AGCATACGTT	480
	GATTTACTCG	TGAATTACGA	GGTGAAACAC	CGTATTTTAG	TAAAATATGA	AGGTAAAGTT	540
	$\Lambda\Lambda\Lambda GGT\Lambda G\Lambda G$	CTCCCTTAGA	$\Lambda GC\Lambda TTT\Lambda T\Lambda$	${\tt GTTCCTCTAA}$	${\sf G}{\sf A}{\sf G}{\sf A}{\sf T}{\sf A}{\sf G}{\sf A}{\sf A}{\sf T}$	TCGTAGTATG	600
	AATGAAATTG	CTGCAGAAGT	${\bf A}{\bf A}{\bf A}{\bf T}{\bf T}{\bf T}{\bf T}{\bf A}$	CCTGAAGCGC	${\bf ATGAGGATTT}$	CTTAGTTTCA	660
	GATTCAAGCG	AGTATAATGA	CAAACTAAAT	AATATCAACT	${\tt TTGCTTTGGG}$	TCTAGGGGTC	720
	AGCGAGTTTA	TTGACTATAA	CCGGCTCGAA	$\mathbf{\Lambda}\mathbf{\Lambda}\mathbf{T}\mathbf{\Lambda}\mathbf{T}\mathbf{G}\mathbf{\Lambda}\mathbf{T}\mathbf{G}\mathbf{G}$	AAAAAGAACT	TCATCCACTG	780
-	TATCTTGAAC	TTTATGCTAT	GCGGAGAAAT	CGCCAAATTC	AAGTTGTAAG	AGATGTATAT	840
	CCAAACTTGG	AACGTGCGAA	CGCGGTTGTT	GAATCCTTAA	AGACAATTAA	AGATATAAAA	900
	CAAAGAGGGA	AGAAACTACA	GGAACTTCTT	GAAATTTATA	TCCAAAGAAG	TGGAGATGTT	960
	CGAAAACCAG	ATGTACTCCA	ACGATTTATT	GGAAAATATC	AATCAGTAGT	TGATGAAGAA	1020
	AAAAATAAAC	TTCAAGATTA	TTTAGAATCA	GATATTTTTG	ATTCATATAG	TGTGGATGGC	1080
				ATCAATAGAG			1140
				ACGATTCGTG			1200
	AAATCATTCC	AAAATGAAGA	AAGTGACTCT	AAAGTAGAGC	CTGAAAGTCC	CGTTAAAGTA	1260
				GATCAAAAGA			1320
	CCCGAATCGA	ATTCAAAAGA	AGGGTGGATT	AAGAAAGATA	ATAAGTGGTT	CTATATTGAG	1380
				AAGGTAGCAG			1440
				AAGGTAGCAA			1500
				AAAGTATCAA			1560
	AACTCAGGTG	CAATGGCAAC	ACGATCGAAG	AAAGTATCAA	ACAAGTGGTA	CTACCTTGAA	
				AAGGTAGCAA			1680
				AAAGTATCGA			1740
	AACTCAGGCG	CAATGGCTAC	AGGATGGAAA	AAGGTAGCAA	ACAAATGGTA	CTACCTTGAT	-1800
				TCTATTGATG	GTAAAAAGTA	TGCATTTAAG	1860
	AACGATGGAA	GTTTAAAATA	Λ			•	1881

# 【図5】



pNH300-豚丹毒菌**抗原/**B. brevis HPD31

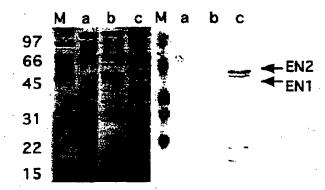
# [図4A]

GAT	TCG	ACA	GAT	ATT	TCT	GTG	ATT	CCA	CTA	ATC	GGT	GAA	CAA	GTT	GGA	48
Asp	Ser	Thr	Asp	lle	Ser	Val	lle	Pro	Leu	Ile	Gly	Glu	Gln	Val	Gly	
				5					10					15		
TTG	CTC	$\overset{\cdot}{\text{CCA}}$	GTT	TTA	CCT	GGG	ACA	GGG	GTA	CAT	GCT	CAG	GAA	TAC	AAC	96
Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Pro	Gly	Thr	Gly	Val	His	Ala	Gln	Glu	Tyr	Asn	
			20					25					30			
AAA	ATG	ACT	GAT	GCT	TAT	ATT	GAA	AAA	TTG	GTA	TCT	CTA	ATT	AAT	CVV	144
Lys	Met	Thr	Asp	Ala	Туг	Пe	Glu	Lys	Leu	Val	Ser	Leu	He	Asn	Gln	
		35					40					45				
										AAG						192
Lys	Val	Lys	Pro	Phe	Leu	He	Asn	Glu	Pro	Lys	Gly	Tyr	Gln	Ser	Phe	
	50		•			55					60					
GAΛ	GCA	GTG	ΛΛΤ	GAA	GAG	ATT	AAC	TCG	ATT	GTA	AGT	GAA	CTT	AAA	AAT	240
	Ala	Val	Asn	Glu		He	Asn	Ser	Ile	Val	Ser	Glu	Leu	Lys		
65					70				<u> </u>	75					80	
																288
Glu	Gly	Met	Ser		Gln	Asn	Ыe	His		Met	Phe	Lys	Gln		He	
				85					90				242	95	CCT	*1437*
										AGT						336
Gln	Asn	Leu	Ala	Thr	Arg	He	Gly	Tyr	Arg	Ser	Phe	Met	GIn	Asp	Ala	
								_	6							
			100					105	,				110	CAT	01.6	004
			GAA					105 TTA	ACG	ATT	CCT	,	CTT			384
		Leu	GAA				Arg	105 TTA	ACG		CCT	Glu	CTT			384
Met	Tyr	Leu 115	GAA Glu	Asn	Phe	Glu	Arg 120	105 TTA Leu	ACG Thr	ATT Ile	CCT Pro	Glu 125	CTT Leu	Asp	Glu	. ,
Met	Tyr	Leu 115 GTT	GAA Glu GAT	Asn TTA	Phe	GIu GTG	Arg 120 AAT	105 TTA Leu TAC	ACG Thr	ATT lle	CCT Pro	Glu 125 CAC	CTT Leu CGT	Asp	Glu TTA	384 432
Met	Tyr TAC Tyr	Leu 115 GTT	GAA Glu GAT	Asn TTA	Phe	Glu GTG Val	Arg 120 AAT	105 TTA Leu TAC	ACG Thr	ATT Ile	CCT Pro AAA Lys	Glu 125 CAC	CTT Leu CGT	Asp	Glu TTA	. ,
Met GCA Ala	Tyr TAC Tyr 130	Leu 115 GTT Val	GAA Glu GAT Asp	Asn TTA Leu	Phe CTC Leu	GIu GTG Val 135	Arg 120 AAT Asn	105 TTA Leu TAC Tyr	ACG Thr GAG Glu	ATT lle GTG Val	CCT Pro AAA Lys 140	Glu 125 CAC His	CTT Leu CGT Arg	Asp ATT Ile	Glu TTA Leu	432
Met GCA Ala GTA	TAC Tyr 130	Leu 115 GTT Val	GAA Glu GAT Asp GAA	Asn TTA Leu GGT	Phe CTC Leu	GIu GTG Val 135 GTT	Arg 120 AAT Asn	105 TTA Leu TAC Tyr	ACG Thr GAG Glu AGA	ATT lle GTG Val	CCT Pro AAA Lys 140 CCC	Glu 125 CAC His	CTT Leu CGT Arg	ASP ATT Ile GCA	Glu TTA Leu TTT	. ,
Met GCA Ala GTA Val	TAC Tyr 130	Leu 115 GTT Val	GAA Glu GAT Asp GAA	Asn TTA Leu GGT	Phe CTC Leu AAA Lys	GIu GTG Val 135 GTT	Arg 120 AAT Asn	105 TTA Leu TAC Tyr	ACG Thr GAG Glu AGA	ATT lle GTG Val GCT Ala	CCT Pro AAA Lys 140 CCC	Glu 125 CAC His	CTT Leu CGT Arg	ASP ATT Ile GCA	Glu TTA Leu TTT Phe	432
Met GCA Ala GTA Val 145	Tyr TAC Tyr 130 AAA Lys	Leu 115 GTT Val TAT Tyr	GAA Glu GAT Asp GAA Glu	Asn TTA Leu GGT Gly	Phe CTC Leu AAA Lys 150	GIU GTG Val 135 GTT Val	Arg 120 AAT Asn AAA Lys	TTA Leu TAC Tyr GGT Gly	ACG Thr GAG Glu AGA Arg	ATT lle GTG Val GCT Ala 155	CCT Pro AAA Lýs 140 CCC Pro	Glu 125 CAC His TTA Leu	CTT Leu CGT Arg GAA Glu	ASP ATT Ile GCA Ala	TTA Leu TTT Phe 160	<b>432 480</b>
Met GCA Ala GTA Val 145 ATA	Tyr TAC Tyr 130 AAA Lys	Leu 115 GTT Val TAT Tyr	GAA Glu GAT Asp GAA Glu CTA	TTA Leu GGT Gly	Phe CTC Leu AAA Lys 150 GAT	GIU GTG Val 135 GTT Val	Arg 120 AAT Asn AAA Lys	TTA Leu TAC Tyr GGT Gly CGT	ACG Thr GAG Glu AGA Arg	ATT The GTG Val GCT Ala 155 ATG	CCT Pro AAA Lýs 140 CCC Pro	Glu 125 CAC His TTA Leu	CTT Leu CGT Arg GAA Glu	ASP ATT Ile GCA Ala GCT	TTA Leu TTT Phe 160 GCA	432
Met GCA Ala GTA Val 145 ATA	Tyr TAC Tyr 130 AAA Lys	Leu 115 GTT Val TAT Tyr	GAA Glu GAT Asp GAA Glu CTA	TTA Leu GGT Gly	Phe CTC Leu AAA Lys 150 GAT	GIU GTG Val 135 GTT Val	Arg 120 AAT Asn AAA Lys	TTA Leu TAC Tyr GGT Gly CGT	ACG Thr GAG Glu AGA Arg	ATT lle GTG Val GCT Ala 155	CCT Pro AAA Lýs 140 CCC Pro	Glu 125 CAC His TTA Leu	CTT Leu CGT Arg GAA Glu	ASP ATT Ile GCA Ala GCT	TTA Leu TTT Phe 160 GCA	<b>432 480</b>

# 【図4B】

GAA	GTA	AAT	TAT	TTA	CCT	GAA	GCG	CAT	GAG	GAT	TTC	TTA	GTT	TCA	GAT	576
		Asn										_		_		
			180					185					190			
TCA	AGC	GAG	TAT	AAT	GAC	AAA	CTA	ΛΛΤ	ΛΛТ	ΛTC	AAC	TTT	GCT	TTG	GGT	624
Ser	Ser	Glu	Tyr	Asn	Asp	Lys	Leu	Asn	Asn	He	Asn	Phe	Ala	Leu	Gly ·	
		195					200		``			205				
CIV	GGG	GTC	AGC	GAG	TTT	ATT	GAC	TAT	AAC	CGG	CTC	GAA	AAT	ATG	ATG	672
Leu	Gly	Val	Ser	Glu	Phe	Ile	Asp	Tyr	Asn	Arg	Leu	Glu	Asn	Met	Met	
	210					215					220					
GAA	$\Lambda\Lambda\Lambda$	GΛΛ	CTT	CAT	CCA	CTG	TAT	CTT	GAA	CTT	TAT	GCT	ATG	CGG	AGA	720
Glu	Lys	Glu	Leu	His	Pro	Leu	Tyr	Leu	Glu,	Leu	Tyr	Aĺa	Met	Årg	Arg	
225	,				230					235					240	
AAT	CGC	CAA	ATT	CAA	GTT	GTA	AGA	GAT	GTA	TAT	CCA	$\Lambda\Lambda C$	TTG	GAA	CGT	768
Asn	Arg	Gln	He	Gln	Val	Val	Arg	Asp	Val	Tyr	Pro	Asn	Leu	Glu	Arg	
				245			٠		250					255		
GCG	AAC	GCG	GTT	GTT	GAA	TCC	TTA	AAG	ACA	ĄŢŹ	AAA	GAT	ATA	AAA	CAA	816
Ala	Asn	Ala	Val	Val	Glu	Ser	Leu	Lys	Thr	lle	Lys	Asp	lle	Lys	Gln	
			260		•			265					270			
AGA	GGG	AAG	AAA	CTA	CAG	GAA	CTT	CTT	GAA	ATT	TAT	ATC	CAA	AGA	AGT	864
Arg	Gly	l.ys	Lys	Leu	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	He	Tyr	Ile	Gln	Arg	Ser	
		275					280					285				
GGA	GAT	GTT	CGA	AAA	CCA	GAT	GTA	CTC	CAA	CGA	TTT	ATT	GGA	AAA	TAT	912
Gly	Asp	Val	Arg	Lys	Pro	Asp	Val	Leu	Gln	Arg	Phe	Ile	Gly	Lys	Туг	
,	290	•				295					300					
CAA	TCA	GTA	GTT	GAT	GAA	GAA	AAA	AAT	AAA	CTT	CAA	GAT	TAT	TTA	GAA	960
Gln	Ser	Val	Val	Asp	Ģlu	Glu	Lys	Asn	Lys	Leu	Gln	Asp	Tyr	Leu	Glu	
305					310					315					320	
TCA	GAT	ATT	TTT	GAT	TCA	TAT	AGT	GTG	GAT	GGC	GÁG	AAA	ATA	AGA	AAT	1008
Ser	Asp	He	Phe	Asp	Ser	Tyr	Ser	Val	Λsp	Gly	Glu	Lys	He	Årg	Aśn	
				325		,			330					335		
AAA	GAA	TTA	ACA	CTC	ATC	AAT	AGA	GAT	GCA	TAC	TTA	TCT	ATG	ATT	TAC	1056
Lys	Glu	Ile	Thr	Leu	He	Asn	Arg	Asp	Ala	Tyr	Leu	Ser	Met	He	Tyr	
			340					345					350			

[図6]



M: Low Marker(CBB).

Pre-stain Marker(western blot)

a: pNY326培養上清

b: pNY326-EN1培養上清

c: pNY326-EN2培養上清

sample 4  $\mu$  Q

CBB染色 western blot

## 【手続補正書】

【提出日】平成12年2月17日(2000.2.1 7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項16

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項16】 請求項1もしくは7に記載のポリペプチドまたは請求項11もしくは12に記載の抗体の、ワクチン接種動物 (ヒトを除く) または移行抗体を保有する幼弱動物 (ヒトを除く) の豚丹毒菌感染防御免疫レベル 30の評価、あるいは動物 (ヒトを除く) の豚丹毒菌感染の検出への使用方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0017

【補正方法】変更

【補正内容】

【0017】(15) 豚丹毒菌に感染したかまたは感染する可能性のある動物(ヒトを除く)に、上記(1)または(7)に記載のポリペプチドとrmLTアジュバントとの 40混合物を、場合によりさらに担体を加えて、鼻腔内投与等の経粘膜投与することを含む、豚丹毒菌攻撃に対する感染、発病防御免疫誘導する方法。

(16) 上記(1)もしくは(7)に記載のポリペプチドまたは上記(11)もしくは(12)に記載の抗体の、ワクチン接種動物(ヒトを除く)または移行抗体を保有する幼若動物(ヒトを除く)の豚丹毒菌感染防御免疫レベルの評価、あるいは動物(ヒトを除く)の豚丹毒菌感染の検出への使用方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正内容】

【0022】このような変異の仕方には制限はないが、 例えば配列番号 1 に示すポリペプチドをコードするDN A配列を基にオリゴヌクレオチド部位特異的突然変異法 やカセット変異法などの部位特異的突然変異技術(例え ばShort Protocols In Molecular Biology, Third Edit ion. A Compendium of Methods from Current Protocol s in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. 参 照)、PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)などの技術を用 いて変異DNAを得て、これを適当な宿主細胞で発現さ せて製造することができる。アミノ酸間の置換では、酸 性アミノ酸同士、塩基性アミノ酸同士、疎水性アミノ酸 同士で構造的に類似するアミノ酸間の置換があり、この ような置換は天然においても認められる。例えばバリン とイソロイシン、グルタミン酸とアスパラギン酸、アル ギニンとリシンが置換例としてあげられる。欠失につい ては、配列番号1に示すアミノ酸配列のN末の60アミ ノ酸以外の(単数または複数の)アミノ酸の部分的欠失が 考えられるが、あくまでも豚丹毒菌に対する感染、発病 防御免疫誘導活性を損なわない範囲で欠失を行う必要が ある。付加の場合にも防御免疫誘導活性を損なわない範 囲の変異でなければならないが、例えばN末またはC末 への(単数または複数の)アミノ酸の付加が可能である う。この場合、豚丹毒菌 6 9 kDa感染防御抗原(今田、上 記)に認められるN末の29アミノ酸からなる分泌シグ ナル配列と、C末の繰り返し配列を含む179アミノ酸か らなる配列は含むべきではない。配列番号1に示すアミ ノ酸配列とのアミノ酸レベルでの相同性(整列比較によ

る配列類似性)で言えば、上記変異体は95%を超える 相同性を有しているべきである。 この点では、豚丹毒菌 のFujisawa株、その変異体だけでなく、その他の株(例 えば豚丹毒菌1b型、2a型、2b型など)およびその変異体に由来する同様の抗原断片のすべてが本発明の範囲内である。

フロントペー	- ジの続き		
(51) Int. Cl.	7	FI	テーマコート(参考)
C07K	16/12	CO7K 16/12	
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P 21/02	С
	21/08	21/08	
G 0 1 N	33/569	GO1N 33/569	F
	33/577	33/577	В
//(C12N	.15/09 Z N A		
C12R			
(C12P	21/02		•
C12R	1:08)		
•		•	
(72) 発明者	高木 広明	(72) 発明者 今田 由美子	
	千葉県銚子市中央区2番地の8 ヒゲタ醤 20	茨城県つくば市吾妻 1	丁目18-1 405-
	油株式会社研究部内	404	
(72) 発明者	恵比寿 省吾	(72) 発明者 辻 孝雄	
•	千葉県銚子市中央区2番地の8 ヒゲタ醤	愛知県豊明市沓掛町田	楽ヶ窪 1 -98 学校
	油株式会社研究部内	法人 藤田学園内	
(72) 発明者	渡辺 史子	Fターム(参考) 4B024 AA01 BA31	BA43 CA04 DA07
	千葉県銚子市中央区2番地の8 ヒゲタ醤	EA04 GA05	GA11 HA01
	油株式会社研究部内	4B064 AG27 AG31	CA02 CA10 CA19
(72) 発明者	村橋 保昭	CA20 CC24	DA01
	千葉県銚子市中央区2番地の8 ヒゲタ醤	4C085 AA03 AA13	AA14 AA38 BA13
	油株式会社研究部内 30	CC07 CC23	CC32 DD61 EE01
(72) 発明者	横溝 祐一	EE06 FF14	FF19 GG10
	茨城県つくば市並木4丁目11 919-103	4H045 AA10 AA11	AA30 BA10 CA42
		DA76 DA86	<b>EA29 FA72 FA74</b>
		GA22 GA23	
	•	÷	•